

Aus dem Institut für Anatomie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Die Expression von Natrium- Transportproteinen im distalen Rattennephron während der Ontogenese

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Roland Schmitt
aus Bonn

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

Gutachter: 1. Prof. Dr. S. Bachmann

2. Prof. Dr. H. Koepsell

3. Prof. Dr. V. Vallon

Datum der Promotion: 22. Mai 2000

INHALTSVERZEICHNIS

Im Text verwendete Abkürzungen	5
1 EINLEITUNG	7
1.1 Natrium transportierende Proteine im distalen Nephron	7
1.2 Einführung in die Nephrogenese der Säugerniere	13
2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	16
3 MATERIAL UND METHODEN	18
3.1 Versuchstiere und Gewebeprozessierung	18
3.1.1 Perfusionsfixierung und Gewebsprozessierung für Immunhistochemie und In situ-Hybridisierung	18
3.1.2 Perfusionsfixierung und Gewebsprozessierung für feinstrukturelle Morphologie	18
3.2 Morphologische Analyse	19
3.2.1 Lichtmikroskopische Morphologie	19
3.2.2 Elektronenmikroskopische Morphologie	19
3.3 In situ-Hybridisierung	20
3.3.1 In situ-Hybridisierung mit nicht-radioaktivem Detektionssystem	20
3.3.1.1 Präparation der cDNA-Matrizen	20
3.3.1.2 In vitro-Transkription zur Herstellung Digoxigenin-markierter Riboproben	21
3.3.1.3 Hybridisierung Digoxigenin-markierter Riboproben	22
3.3.1.4 Entfernen nicht hybridisierter Riboproben	23
3.3.1.5 Detektion der hybridisierten Riboproben	23
3.3.2 Autoradioaktiv markierte In situ-Hybridisierung	24
3.3.2.1 Präparation der cDNA-Matrizen	24
3.3.2.2 In vitro-Transkription zur Herstellung (³⁵ S)-markierter Riboproben	24
3.3.2.3 Hybridisierung (³⁵ S)-markierter Riboproben	25
3.3.2.4 Entfernen nicht hybridisierter Riboproben	25
3.3.2.5 Detektion der hybridisierten Sonden	25

3.4	Immunhistochemie	26
3.4.1	Verwendete Primärantikörper	26
3.4.2	Antikörperinkubation und Antikörperdetektion	27
3.5	Kombinierte In situ-Hybridisierung und Immunhistochemie	28
4	ERGEBNISSE	29
4.1	Expression von NKCC2 und NaPi2	29
4.2	Expression von NCC und NaCa	37
4.3	Expression von 11HSD	42
4.4	Expression von rENaC	44
5	DISKUSSION	50
5.1	Henle'sche Schleife und Macula densa (MD)	50
5.2	Distales Konvolut (DCT)	54
5.3	Verbindungstubulus (CNT)	58
5.4	Sammelrohr (CD)	61
6	ZUSAMMENFASSUNG	66
7	LITERATURVERZEICHNIS	69

Im Text verwendete Abkürzungen

11HSD	11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 2
AL	Ascending Limb (aufsteigender Schenkel der Henle´schen Schleife)
AME	Apparent Mineralocorticoid Excess (apparenter Mineralokortikoidüberschuß)
ATL	Ascending Thin Limb (dünner Teil des aufsteigenden Schenkels der Henle´schen Schleife)
Ca ⁺⁺	ionisiertes Calcium
CCD	Cortical Collecting Duct (kortikales Sammelrohr)
CD	Collecting Duct (Sammelrohr)
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
Cl ⁻	ionisiertes Chlorid
CNT	Connecting Tubule (Verbindungstubulus)
DCT; DCT1, DCT2	Distal Convolutet Tubule (distales Konvolut); Segment 1, 2
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DL	Descending Limb (absteigender Schenkel der Henle´schen Schleife)
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DT	Distaler Tubulus
DTL	Descending Thin Limb (dünner Teil des absteigenden Schenkels der Henle´schen Schleife)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENaC	Epithelial Na ⁺ Channel (epithelialer Na ⁺ -Kanal)
K ⁺	ionisiertes Kalium
MCD	Medullary Collecting Duct (medulläres Sammelrohr)
MR	Mineralokortikoidrezeptor
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
Na ⁺	ionisiertes Natrium
NaCa	Na ⁺ /Ca ⁺⁺ -Austauscher
NaPi2	Na ⁺ -anorganisches Phosphat Kotransporter Typ2

NCC	Na^+ - Cl^- -Kotransporter
NKCC2	Na^+ - K^+ -2 Cl^- -Kotransporter Typ 2
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion) Proximaler
PT	Tubulus
PST	Proximal Straight Tubule (Proximaler gestreckter Tubulus)
rENaC	rat Epithelial Na^+ Channel (epithelialer Na^+ -Kanal der Ratte)
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RT-PCR	Reverse Transkriptase - PCR
SSC	Standard Sodium Citrate (NaCl -Citrat Puffer)
TAL	Thick Ascending Limb (dicker Teil des aufsteigenden Schenkels der
Tris	Henle'schen Schleife)
	Trishydroxymethyl-aminomethan

1 Einleitung

1.1 Natrium transportierende Proteine im distalen Nephron

Angesichts sich ständig ändernder Umweltbedingungen muß im Säugerorganismus die Zusammensetzung des “inneren Milieus”, d. h. die Zusammensetzung der Körperflüssigkeiten, in relativ engen Grenzen konstant gehalten werden. Dabei kommt der Niere als Regulationsorgan für die extrazelluläre Volumen- und Elektrolythomöostase eine besondere Bedeutung zu. Um die Anpassung an wechselnde biologische Verhältnisse zu ermöglichen, ist die adaptative Einstellung der renalen Natriumexkretion und –konservierung entscheidend. Natrium (Na^+), das das Hauptelektrolyt des extrazellulären Milieus darstellt, wird im Glomerulum frei filtriert und entlang des Tubulus unter Normalbedingungen fast vollständig reabsorbiert. Obwohl sich der Hauptteil der Na^+ -Reabsorption (ca. 60%) bereits im proximalen Tubulus (PT) abspielt, ist der distale Tubulus (DT) das entscheidende Segment für die adaptative Einstellung der renalen Na^+ -Ausscheidung. Weitgehend unabhängig vom aktuellen Zustand des inneren Milieus reagiert der PT nämlich auf eine Änderung der filtrierten Na^+ -Menge mit einer Anpassung seiner Reabsorptionsleistung. Durch diesen Mechanismus, der als “glomerulotubuläre Balance” beschrieben wird, bleibt der prozentuale Anteil der proximaltubulären Reabsorption, unabhängig von der glomerulär filtrierten Menge, praktisch konstant [Brunner et al. 1966]. Die Reabsorption des DT hingegen steht in entscheidendem Maße unter hormoneller Kontrolle und wird je nach Zustand des inneren Milieus reguliert. Somit stellt das distale Tubulussegment die eigentliche Regelstrecke für die renale Volumen- und Elektrolythomöostase dar [Überblick in Hierholzer et al. 1995].

Der DT setzt sich zusammen aus dem dicken Teil der aufsteigenden Henle’schen Schleife (TAL = thick ascending limb of the loop of Henle), dem distalen Konvolut (DCT = distal convoluted tubule), dem Verbindungstubulus (CNT = connecting tubule) und dem kortikalen sowie dem medullären Sammelrohr (CCD = cortical collecting duct; MCD = medullary collecting duct) [Überblick in Bachmann 1998]. Jedes dieser Segmente weist ein spezifisches Expressionmuster an luminalen Ionentransportern auf, die die Rückresorption von Na^+ bestreiten. In jüngerer Zeit ist es gelungen, verschiedene dieser Na^+ -reabsorbierenden

Transportproteine, die entlang des distalen Tubulus exprimiert werden, zu klonieren und zu charakterisieren [Canessa et al. 1993, Gamba et al. 1994, Igarashi et al. 1995, Überblick in Bachmann 1999]. Das große Interesse, das diesen Transportern seither entgegengebracht wurde, erklärt sich nicht zuletzt dadurch, daß die Gene, die für diese kodieren, potentielle “Kandidatengene” für die salzabhängige Form der essentiellen Hypertonie darstellen [Rossier 1997]. Nachdem schon vor längerer Zeit spekuliert wurde, daß die wahrscheinlichsten der lange gesuchten Kandidatengene der essentiellen Hypertonie entlang des Nephrons exprimiert sein könnten [Guyton 1991], hat die Klonierung der distaltubulären Na^+ -Transportproteine einen konkreten Einblick in jene Mechanismen, die bei der individuellen Blutdruckvariabilität eine Rolle spielen könnten, ermöglicht. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Na^+ -Transporter und die Krankheitsbilder, die aus einer Dysfunktion dieser Transporter resultieren, sind im folgenden beschrieben.

Ein elektroneutral arbeitender Kotransporter, der jeweils ein Ion Na^+ zusammen mit einem Ion Kalium (K) und zwei Chloridionen (Cl^-) transportiert, tritt in zwei Isoformen auf. Die erste Isoform ist sekretorisch und kommt in salzsezernierenden Epithelien vor (NKCC1), die zweite Isoform (NKCC2) ist reabsorptiv und kann durch Diuretika wie Furosemid, Bumetanid oder Etacrynsäure gehemmt werden [Überblick in Haas 1994]. NKCC2 wird in Tubuluszellen entlang des TAL exprimiert. Ein verwandter, ebenfalls elektroneutral arbeitender Kotransporter (NCC) wird in DCT-Zellen exprimiert, wo er Na^+ und Cl^- in einer Stöchiometrie von 1:1 in die Zelle befördert. Dieser Kotransporter ist durch Benzothiadiazinderivate wie Chlorothiazid hemmbar [Gamba et al. 1993, Bachmann et al. 1995]. Beide Transportproteine sind in die apikale Membran der Tubuluszelle eingebaut und arbeiten sekundär aktiv, indem sie den Na^+ -Konzentrationsgradienten, der durch die basolateral lokalisierte Na^+/K^+ -ATPase aufrechterhalten wird, ausnutzen.

Inzwischen sind für die Gene, die für die beiden Kotransporter kodieren, Mutationen beschrieben worden, die in homozygoter Form zu klinischen Syndromen führen. So resultiert aus einer Mutation des für NKCC2-kodierenden Gens der Typ I des sogenannten Bartter-Syndroms [Simon et al. 1996a, Simon et al. 1998]. Das Bartter-Syndrom zeichnet sich durch eine hypokaliämische Alkalose, Hyperkalziurie, renalen Salzverlust und erniedrigten Blutdruck aus. Mutationen in dem für NCC kodierenden Gen führen zum Gitelman-Syndrom,

bei dem es ebenfalls zu hypokaliämischer Alkalose, renalem Salzverlust und erniedrigtem Blutdruck kommt, wo aber statt der Hyperkalziurie eine Hypokalziurie vorherrscht [Simon et al. 1996b, Simon et al. 1998]. Da sich das Bartter- und auch das Gitelman-Syndrom erst dann klinisch manifestieren, wenn die mutierten Allele in homozygoter Form vorliegen, sind diese Krankheitsbilder relativ selten. Einer interessanten Hypothese zufolge könnte aber auch die wesentlich häufiger vorkommende heterozygote Form der entsprechenden Genmutationen eine klinisch relevante Rolle spielen [Lifton 1996, Simon et al. 1998]. Demnach würde der heterozygote Genstatus zu einer latent leicht verminderten distaltubulären Salzreabsorption führen, was mit einer antihypertensiven, niedrigdosierten Diuretikadauertherapie vergleichbar wäre. Dies könnte einen genetischen, also vererbaren, Schutz vor salzabhängiger Hypertonie darstellen und zur Erklärung der sehr individuellen Blutdruckabhängigkeit bei salzreicher Diät beitragen. Darüberhinaus könnte der heterozygote Trägerstatus einer Mutation für NKCC2 durch latente Hyperkalziurie aber auch zu einer erhöhten Prädisposition für Nephrolithiasis und Osteoporose führen [Simon et al. 1998]. Eine heterozygote Mutation für NCC mit latenter Hypokalziurie könnte hingegen eine unterdurchschnittlich geringe Anfälligkeit für diese Leiden erklären. Auch in bezug auf Patienten, die auf niedrig dosierte Diuretikatherapie mit einem unerwartet hohen K-Verlust reagieren, wurde als mögliche Ursache ein heterozygoter Allelstatus diskutiert [Simon 1996a]. Dabei würde die Diuretikatherapie ein normalerweise weitgehend kompensiertes Defizit an distaler Salzreabsorption durch NKCC2 oder NCC in klinische Erscheinung treten lassen.

Neben NKCC2 und NCC spielt der aldosteronabhängige, epitheliale Na^+ -Kanal (ENaC oder rENaC für die Ratte) eine herausragende Rolle bei der distaltubulären Na^+ -Reabsorption. Dieser für Na^+ hochselektive Kanal ist aus drei Untereinheiten (α -, β - und γ -Untereinheit) aufgebaut und durch Amiloriddiuretika inhibierbar [Canessa et al. 1993 und 1994, Rossier et al. 1994, Überblick in Rossier 1997]. Er ermöglicht den apikalen Einstrom von Na^+ entlang des Konzentrationsgefälles in die Tubuluszelle. Unter Stimulation durch Mineralokortikoide wird ENaC verstärkt exprimiert und aktiviert, was sich darin äußert, daß die Na^+ -Reabsorption via ENaC von einem Niveau unterhalb der Nachweisgrenze innerhalb weniger Stunden auf ein sehr hohes Niveau anwachsen kann [Rossier et al. 1992 und 1994].

Für ENaC sind Mutationen beschrieben, die sowohl zu einer Unter- als auch zu einer Überfunktion des Kanals führen können. So liegt beim sogenannten Liddle-Syndrom ein

Defekt in der β - oder der γ -Untereinheit von ENaC vor, der zu einer verlangsamten physiologischen Degradation und damit zur Überfunktion des Kanals führt [Shimkets et al. 1994, Hansson et al. 1995]. Es resultiert eine autosomal-dominant vererbare Krankheit, die durch eine frühe und schwerwiegende Form der Hypertonie mit Hypokaliämie und metabolischer Alkalose charakterisiert ist. Eine mutationsbedingte Unterfunktion von ENaC liegt beim Pseudohypoaldosteronismus Typ I vor [Chang et al. 1996]. Ursache ist eine Mutation des für die α -Untereinheit kodierenden Gens, woraus bei homozygotem Vorliegen eine hypovolämische Hyponatriämie mit Hyperkaliämie und metabolischer Azidose resultiert.

Physiologischerweise steht die Funktion ENaCs unter der Kontrolle durch Aldosteron. Dabei passiert zirkulierendes Aldosteron die Zellmembran von Mineralokortikoidzielzellen und bildet zusammen mit dem intrazellulären Mineralokortikoidrezeptor (MR) einen Komplex, der auf epigenetischer Ebene Transkriptionsvorgänge reguliert [Arriza et al. 1987], welche u.a. die Aktivität von ENaC steuern [Rossier et al. 1994]. Bei der selektiven Bindung von Aldosteron an den MR spielt ein interessanter Mechanismus, der durch das Enzym 11 β -Hydroxysteroid-dehydrogenase Typ 2 (11HSD) vermittelt wird, eine entscheidende Rolle. Es ist bekannt, daß der MR in bezug auf seine hormonbindende Domäne eine ausgeprägte Homologie zum Glukokortikoidrezeptor besitzt, und daß er in vitro Glukokortikoide und Mineralokortikoide mit gleicher Affinität bindet [Arriza et al. 1987, Krozowski et al. 1983, Funder et al. 1988]. Bedenkt man nun, daß in vivo hundert- bis tausendfach mehr Glukokortikoid als Mineralokortikoid vorliegt, wäre anzunehmen, daß der MR permanent durch Glukokortikoide besetzt sein müßte. Erstaunlicherweise präsentiert sich der Rezeptor in vivo aber mineralokortikoidspezifisch. Diese Spezifität wird durch 11HSD vermittelt, welches die natürlichen Glukokortikoide (im Menschen Kortisol und in der Ratte Kortikosteron) in ihre 11-Dehydro-Metabolite umsetzt. Für diese Metabolite weist der MR nur sehr geringe Affinität auf [Funder et al. 1988]. Ist die katalytische Wirkung von 11HSD gestört, wie es bei einer Mutation im kodierenden Gen vorkommen kann, so bezeichnet man das sich daraus ergebende klinische Bild als apparenten Mineralokortikoidüberschuß (AME). Dabei kommt es durch eine starke Stimulation des MR durch Glukokortikoide zu schwerer Hypertonie und Hypokaliämie [Ulick et al. 1989]. Eine mildere Form dieses Krankheitsbildes resultiert aus einer chemischen Inhibition von 11HSD durch Glycyrrhizinsäure, einem Bestandteil des Süßholzstrauches, der in verschiedenen Süßigkeiten, vor allem in Lakritz, enthalten ist. Die Inhibition von 11HSD erklärt somit die aldosteronähnliche Wirkung, die bei

übermäßigen Verzehr von Lakritz beobachtet wird, und die gut auf Behandlung mit Spironolacton anspricht [Armanini et al. 1983, Walker et al. 1991].

Die besondere klinische Relevanz der distaltubulären Na^+ -Transporter geht aber nicht nur auf die oben beschriebenen klinischen Syndrome und ihren möglichen Einfluß auf die salzabhängige Blutdruckvariabilität zurück, sondern auch auf die entscheidende Rolle, die die Transporter als Angriffspunkt klinisch täglich eingesetzter Diuretika spielen. Obwohl der distale Na^+ -Transport schon seit Jahrzehnten den Hauptangriffspunkt der wichtigsten Diuretika darstellt [Überblick in Ellison 1994], ist es erst durch das Klonieren der angesprochenen Transporter möglich geworden den genauen Wirkmechanismus der verschiedenen Diuretikaklassen zu erforschen und ihren diuretischen Effekt definierten Tubulussegmenten zuzuordnen. Inzwischen wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen eine detaillierte Lokalisation der Proteine im adulten Nephron erarbeitet [Bostanjoglo et al. 1998, Duc et al. 1994, Obermüller et al. 1995 und 1996, Plotkin et al. 1996]. Durch die Ergebnisse dieser Arbeiten wurde es möglich, eine präzise, funktionelle Subsegmentation des distalen Nephrons zu erstellen, die über eine rein morphologische Gliederung hinausgeht [Überblick in Bachmann 1999].

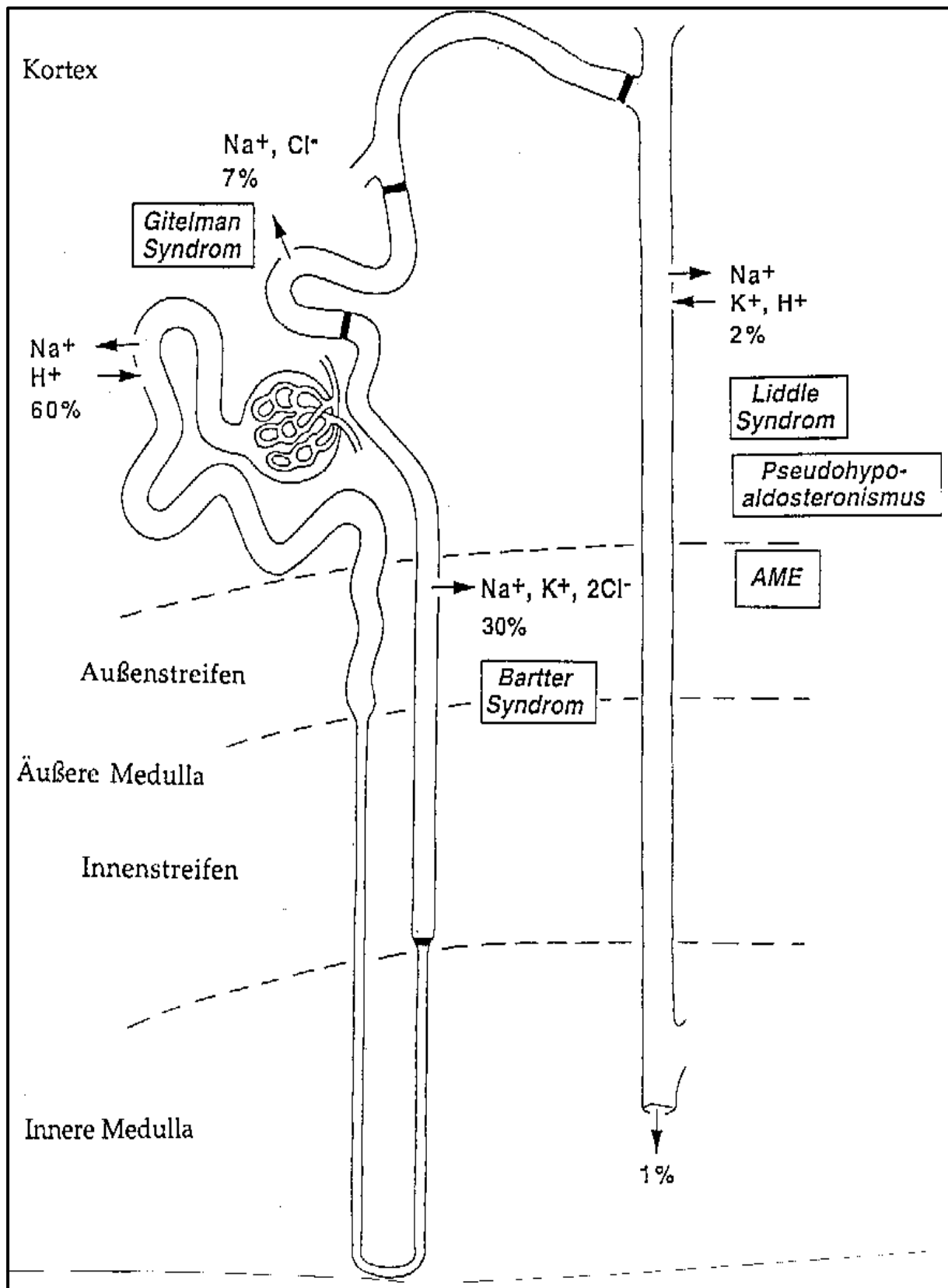


Abb. 1: Schema eines mediokortikalen Nephrons. Die in 1.1 beschriebenen Tubulussegmente sind durch Balken voneinander getrennt, und ihre jeweilige Na^+ -Transportkapazität ist in Prozent angegeben. Die im Text erwähnten distaltubulären Syndrome sind den Tubulusabschnitten zugeordnet, in denen sich ihr Pathomechanismus manifestiert; (in modifizierter Form wiedergegeben aus Bachmann 1998).

1.2 Einführung in die Nephrogenese der Säugerniere

Um die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Begriffe der renalen Ontogenese zu verdeutlichen, sind im folgenden die entscheidenden Schritte der Nephrogenese unter einem morphologischen Gesichtspunkt zusammengefaßt. Im Säugetier vollzieht sich die Nierenentwicklung in kraniokaudaler Richtung, wobei es zunächst im späteren Hals- und Brustbereich zur Formation von renalen Übergangsgebilden (Pronephros und Mesonephros) und später in der Beckenregion zur Bildung der bleibenden Niere (Metanephros) kommt. Das Entstehen von Nierengewebe wird durch ein induktives Wechselspiel zwischen der Ureterknospe, die eine Aussprossung des Urnierengangs darstellt, und dem mesodermalen metanephrogenen Blastem, in das die Ureterknospe einwächst, bestimmt. Die Derivate der Ureterknospe, die nach mehrfacher dichotomer Teilung die Anlage für das spätere Sammelrohrsystem bilden, induzieren bei ihrem Einsprossen in das metanephrogene Blastem die Bildung von Nephronen. Dieser Vorgang findet im äußersten Teil der Nierenanlage, in der sogenannten "nephrogenen Zone" direkt unterhalb der Nierenkapsel, statt. Mit zunehmender Reife werden die älteren nephrogenen Stadien durch in der nephrogenen Zone neu induzierte Nephrone tiefer in die Nierenanlage verlagert, so daß sich ein zentrifugales Muster für die verschiedenen Reifegrade der Nephrogenese ergibt. Die ältesten nephrogenen Stadien befinden sich in der tiefen Kortexregion nahe dem Nierenmark, während die jüngsten Stadien unterhalb der renalen Kapsel zu finden sind (Abb. 2) [Osathanondh et al. 1966].

Die Entwicklung des Nephrons läßt sich in fünf klar differenzierbare Stadien aufteilen [Kazimierczak 1970]. Stadium I entspricht dem Nierenbläschen (renales Vesikel) und ist genau wie Stadium II, welches dem S-förmigen Körperchen (S-shaped Body) entspricht, in der nephrogenen Zone lokalisiert. In Stadium III ist das entstehende Glomerulum oval geformt, und die typischen glomerulären Kapillarschlingen beginnen sich zu entwickeln. Dabei stehen die zylindrisch bis kubisch geformten, viszerale Epithelzellen des Glomerulums sehr dicht zueinander und sind nur durch enge Interzellularspalten voneinander getrennt. In diesem Stadium werden die ersten Anzeichen für den Beginn einer morphologischen Segmentierung des Tubulus offensichtlich. In Stadium IV ist das Glomerulum größer und die Kapillarschlingen zahlreicher als im vorangegangenen Stadium. Die primitive Henle'sche Schleife ist über den medullären Pol des Glomerulums

hinausgewachsen, weist aber noch kein tubuläres Lumen auf. Im fortgeschrittenen Stadium IV hingegen ist in der Henle'schen Schleife ein Lumen vorhanden, wodurch nach Neiss die primitive Schleife zur sogenannten unreifen Schleife wird [Neiss 1982a]. Auf dieser Entwicklungsstufe trägt das Epithel des PT den typischen Bürstensaum, und es lassen sich alle tubulären Segmente, die vom adulten Nephron bekannt sind, auf grob-struktureller Ebene erkennen. In Stadium V kommt es zur terminalen Reifung des Nephrons mit dem endgültigen Auswachsen der einzelnen Segmente.

Verglichen mit anderen Organsystemen erstreckt sich die Entwicklung der Niere und speziell die Formation neuer Nephrone über einen ausgedehnten Zeitraum und wird erst relativ spät während der Ontogenese abgeschlossen. In der Ratte beginnt die Nephrogenese der bleibenden Niere um den 12. Schwangerschaftstag, und es werden noch bis zum 6.-7. Tag post partum neue Nephrone induziert [Larsson 1975, Nigam et al. 1996]. Dadurch liegen während der ersten extrauterinen Tage in der Rattenniere praktisch alle nephrogenen Entwicklungsstadien parallel zueinander vor und ermöglichen eine gleichzeitige Untersuchung anhand eines repräsentativen Querschnitts. Beim Menschen beginnt die Induktion der bleibenden Nephrone in der 8. Schwangerschaftswoche und endet zwischen der 28. und 36. Schwangerschaftswoche, so daß nur bei Frühgeborenen die Nephrogenese noch nach der Geburt fortläuft [Nigam et al. 1996].

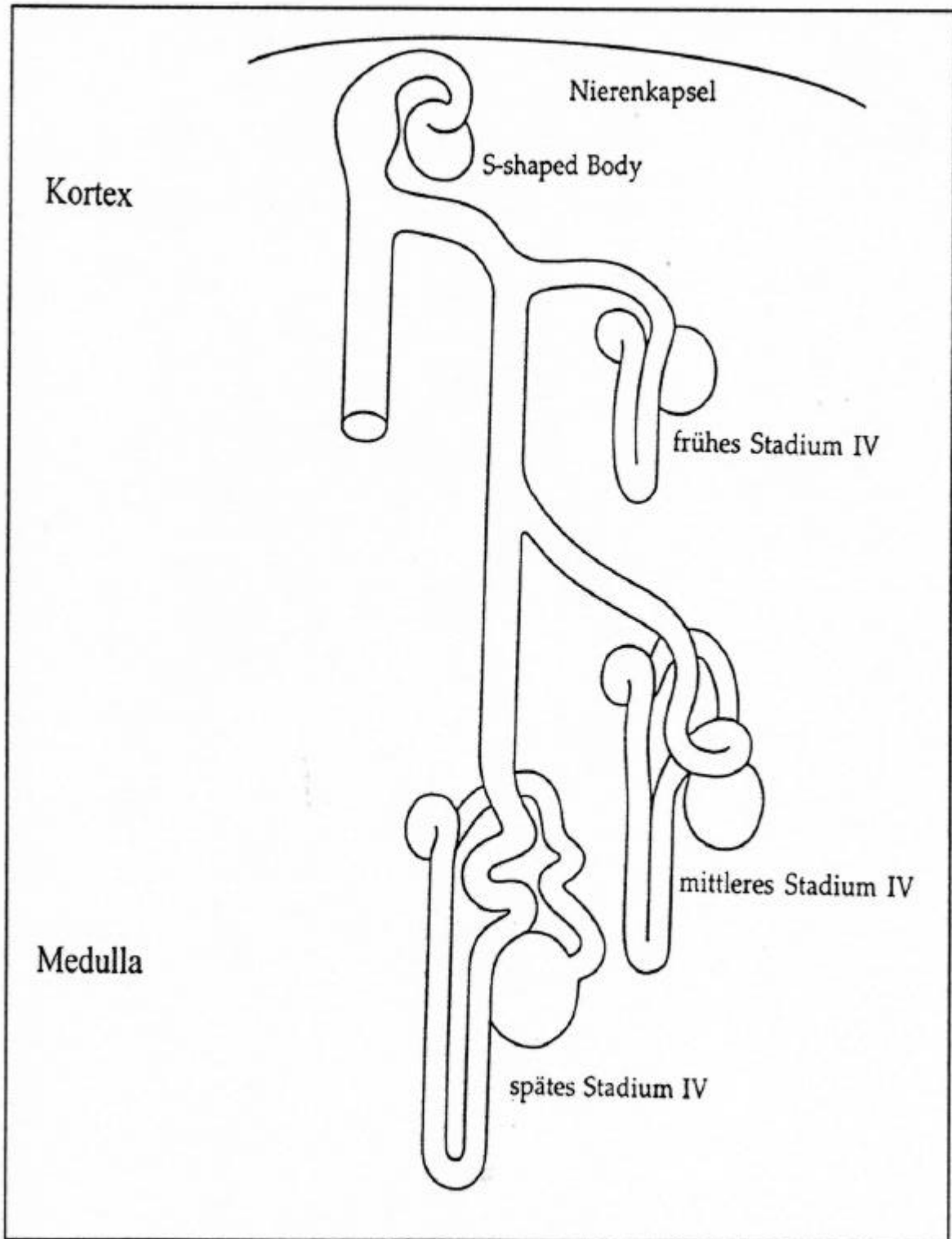


Abb. 2: : Schematische Darstellung der nephrogenetischen Entwicklung, die das zentrifugale Reifungsmuster in der Nierenrinde verdeutlicht. Direkt subkapsulär befinden sich die kurz zuvor induzierten S-förmigen Körperchen, während die Nephrone in Richtung Medulla an Reife zunehmen; (umgezeichnet in Anlehnung an Osathanondh 1966).

2 Zielsetzung der Arbeit

Während die Lokalisation der distaltubulären Na^+ -Transporter entlang des adulten Rattenephrons in den letzten Jahren immer präziser definiert wurde, blieb die Frage über die Expression und Lokalisation der Transportproteine während der Ontogenese lange Zeit unbeantwortet. Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, diese Frage mit Mitteln der hochauflösenden Immunhistochemie und der mRNA-In situ-Hybridisierung zu beantworten. Analog zum bereits etablierten adulten Expressionsmuster sollte ein entsprechendes Expressionsmuster für das sich entwickelnde Nephron erarbeitet werden. Eine detaillierte topographische Definition eines solchen Expressionsmusters für die Ontogenese, und damit ein essentieller Aspekt hinsichtlich funktioneller Vorgänge und Störungen der renalen Na^+ -Reabsorption, fehlte bislang völlig. Dabei ist die ontogenetische Expression von tubulären Na^+ -Transportproteinen nicht nur im Hinblick auf gut charakterisierte, aber relativ seltene, Krankheiten wie dem Bartter-, dem Gitelman-, oder dem Liddle Syndrom relevant, sondern bildet eine essentielle Basis für die Erforschung von vielfältigen nierenabhängigen Defekten und Normvarianten in der Volumenhomöostase, die während der Ontogenese ihren Anfang nehmen können. Das besondere Interesse dieser Arbeit sollte daher auch nicht nur dem initialen Auftreten der Proteine im sich entwickelnden Tubulus zukommen, sondern vor allem auch den topographischen Veränderungen der Transporterexpression im Laufe der Nephronreifung.

Eine weitere Frage, die in dieser Arbeit untersucht werden sollte, bezog sich auf die präzise Lokalisation, bzw. das zeitliche Auftreten von 11HSD in der unreifen Niere. Die Befunde sollten hinsichtlich der funktionellen Korrelation zwischen 11HSD und dem mineralokortikoidabhängigen Na^+ -Kanal, rENaC, analysiert werden.

Neben der im adulten System gut charakterisierten Rolle von 11HSD als Regulator mineralokortikoid-spezifischer Effekte, wurde eine darüberhinausgehende, spezifische Wirkung von 11HSD als wachstumsmodifizierendem Enzym während der Ontogenese diskutiert [Brown et al. 1996, Stewart et al. 1994, Moisan et al. 1992]. In diesem Kontext sollte die Erarbeitung eines Expressionsmusters für 11HSD während der Ontogenese Aufschluß über die potentielle Bedeutung dieses Enzyms in der renalen Entwicklung geben.

Zur genaueren Abgrenzung der distaltubulären Segmente wurde neben den beschriebenen Na^+ -Transportern auch die Expression des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austauschers (NaCa) untersucht. Dieser Transporter ist im adulten Nephron spezifisch am basolateralen Zellpol von CNT-Zellen lokalisiert, wo er Ca^{++} im Austausch gegen Na^+ in einer Stöchiometrie von 2:3 sekundär aktiv zur Blutseite hin aus der Tubuluszelle befördert [Bostanjoglo et al. 1998, Reilly et al. 1993]. In der vorliegenden Studie sollte der Austauscher als Marker von sich differenzierenden CNT-Zellen dienen und somit zur Erkennung der tubulären Subsegmentation beitragen. Außerdem sollte die ontogenetische Reifung des DT in den Kontext der gesamttubulären Nephrogenese eingeordnet werden. Aus diesem Grund wurde die Reifung des PT anhand der Expression des Na^+ -Phosphat Kotransporters Typ 2 (NaPi2) vergleichend untersucht. NaPi2 stellt einen typischen Transporter des PT dar, wo er jeweils ein Phosphation zusammen mit zwei Ionen Na^+ reabsorbiert. Im adulten Nephron ist NaPi2 in hoher Intensität entlang des gesamten PT exprimiert und reabsorbiert das glomerulär filtrierte Phosphat beinahe vollständig [Custer 1994].

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, Einsicht in die Relation zwischen morphologischer und funktioneller Nephronentwicklung zu erlangen. Da sich die meisten ontogenetischen Arbeiten über die Niere bisher entweder ausschließlich mit der Nephronmorphologie oder der Nephronfunktion beschäftigt haben, ist über den Zusammenhang dieser beiden Aspekte sehr wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit sollten daher, nach dem Zuordnen der initialen Proteinexpression zu definierten nephrogenetischen Stadien, analoge Entwicklungsstadien auf ultrastrukturell-morphologischer Ebene vergleichend analysiert werden. Durch lichtmikroskopische Studien an Semidünnschnitten und mit Hilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen sollte auf diese Weise der strukturelle Reifegrad jener Nephrone, die eine initiale Expression von Transportprotein zeigten, definiert werden. Durch diesen Ansatz sollten tiefgehendere Erkenntnisse zur Korrelation von Struktur und Funktion der Tubuluszelle während der Entwicklung gewonnen werden, um die morphologische Ausdifferenzierung des Nierenepithels in einen physiologisch-funktionellen Zusammenhang stellen zu können.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere und Gewebeprozessierung

Für die vorliegende Arbeit wurden Sprague-Dawley Ratten verschiedener postnataler Stadien (Tag 1, 3, 4 und 8 post partum) perfusionsfixiert.

3.1.1 Perfusionsfixierung und Gewebeprozessierung für Immunhistochemie und In situ-Hybridisierung

Die Tiere wurden mit Hilfe von Äther anästhesiert. Der Brustkorb wurde eröffnet und das Herz freipariert. Der Blutkreislauf wurde am linken Ventrikel geöffnet und über einen Polyethylenschlauch mit einem Perfusionssystem verbunden. Zeitgleich mit dem Beginn der Perfusion wurde durch einen Schnitt in das rechte Atrium ein Druckausgleich zum Perfusionsdruck geschaffen. Bei einem konstanten Perfusionsdruck von 1,50 m Wassersäule wurde zuerst für 30 Sek. mit Phosphatpuffer (PBS; 8 g NaCl, 240 mg KH_2PO_4 , 1,78 g Na_2HPO_4 , 200 mg KCl in 1000 ml H_2O ; pH 7,4) vorgespült und anschließend 5 Min. mit Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt) fixiert. Das Paraformaldehyd wurde vor jeder Perfusionsreihe als 3%ige Lösung in PBS frisch angesetzt und auf pH 7,4 eingestellt. Nach der Fixierung wurden die Nieren entnommen, durch einen Horizontalschnitt geteilt und zum Schutz vor Gefrierartefakten für mehrere Stunden bei 4°C in einer Saccharose-PBS Lösung (800 mOsm/kg H_2O , pH 7,4) immerniert. Anschließend wurde das Gewebe auf Styroporplättchen aufgebracht und in Stickstoff-gekühltem Isopentan (Riedel-de Haen, Seelze) schockgefroren.

3.1.2 Perfusionsfixierung und Gewebeprozessierung für feinstrukturelle Morphologie

Die Tiere wurden mit einer intraperitonealen Injektion Nembutal (Sanofi-CEVA, Bad Segeberg; 40 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert. Nach Eröffnung des Bauchraumes wurde die Aorta abdominalis freipariert und über einen ausgezogenen Polyethylenschlauch mit dem Perfusionssystem verbunden. Bei Perfusionsbeginn wurde zum Druckausgleich die

untere Vena cava geöffnet, und die Nieren wurden retrograd zuerst mit PBS vorgespült und anschließend für 5 Min. perfusionsfixiert. Als Fixierlösung diente eine Lösung aus 3% Glutaraldehyd (Merck, Darmstadt) und 1,5% Paraformaldehyd in PBS (pH eingestellt auf 7,4). Nachdem die Nieren entnommen worden waren, wurden mit einer Rasierklinge schmale Gewebelöckchen zugeschnitten. Diese wurden über Nacht bei 4°C in einer Immersionslösung nachfixiert, die in ihrer Zusammensetzung der Perfusionslösung entsprach. Anschließend wurde das Gewebe in einer Ethanolreihe aufsteigender Konzentration (je 15 Min. in 50%, 70%, 90%, 96% Ethanol und 3x 20 Min. 100% Ethanol) entwässert, über Nacht in einem 1:1 Gemisch aus Propylenoxid und Epon (beides Fluka, Buchs, Schweiz) inkubiert und dann in Beem-Kapseln (Roth, Karlsruhe) gegeben, die mit Epon aufgefüllt wurden. Die Aushärtung erfolgte über drei Tage bei 60°C.

3.2 Morphologische Analyse

3.2.1 Lichtmikroskopische Morphologie

An einem Ultramikrotom (LKB, Ultratom 8800) wurden Semidünnschnitte (1µm) von Epon-eingebettetem Gewebe angefertigt und auf Alkohol-gereinigte Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden mit Methylenblau-Azur (nach Richardson) gefärbt und mit Eukitt (Riedel-de Haen) eingedeckt. Die Untersuchung und das Photographieren der Semidünnschnitte erfolgte an einem DMRB Lichtmikroskop der Firma Leica.

3.2.2 Elektronenmikroskopische Morphologie

Ultradünnschnitte (60 nm) für die Transmissions-Elektronenmikroskopie wurden an einem Ultracut-Mikrotom (Leica) angefertigt. Zu diesem Zweck wurden von einem Epon-Gewebelöckchen zuerst so lange Semidünnschnitte heruntergeschnitten und nach Färbung lichtmikroskopisch beurteilt, bis sich interessante Strukturen auf den Schnitten identifizieren ließen. War dies der Fall, so wurden von demselben Gewebelöckchen Ultradünnschnitte hergestellt. Die Schnitte wurden auf Schlitznetzchen (Plano, Wetzlar) aufgebracht, die mit

Formvar (Sigma, St. Louis, USA) beschichtet waren, und wurden mit 5% Uranylacetat (Merck, Darmstadt) für 15 Min., sowie mit Bleicitrat (Merck, Darmstadt) für 2 Min. nachkontrastiert. Die Schnitte wurden an einem ZEISS EM 900 Elektronenmikroskop analysiert und photographiert.

3.3 In situ-Hybridisierung

3.3.1 In situ-Hybridisierung mit nicht-radioaktivem Detektionssystem

3.3.1.1 Präparation der cDNA-Matrizen

Zur Herstellung der Riboproben für NaPi2 wurde aus einem Rattennieren-RNA-Extrakt mittels RT-PCR ein 794 bp langes cDNA-Fragment generiert. Die hierzu nötigen Primer waren entsprechend Magagnin et al. 1993 so gewählt, daß die synthetisierte Sequenz die Positionen 1561-2355 der mRNA für NaPi2 umfaßte (+1561 5' GCAAACGCACTGC-CAAGTACCGC 3' und +2355 5'-CCAGCTGCTCTTCTGCCTCTCC-3'). Die Identität der generierten Probe wurde durch maschinelle Sequenzierung (Perkin-Elmer) abgesichert. Die cDNA wurde in die multiple Klonierungsstelle des Vektors pBluescript KS⁺ (Stratagene, La Jolla, USA), der zuvor mit SmaI (Boehringer, Mannheim) geschnitten worden war, einkloniert. Die cDNAs zur Herstellung der anderen Riboproben waren im Labor von Prof.Dr. S. Bachmann schon zur Anwendung gekommen und lagen bereits in klonierter Form vor. Alle cDNAs waren in die EcoRV Stelle des pBluescript KS⁺ Vektors subkloniert. Diese Klonierungsstelle wird jeweils von einer Promotorstelle für die Transkriptionspolymerasen T3 und T7 flankiert. Im einzelnen handelte es sich bei den cDNAs um ein 712 bp langes cDNA-Fragment des thiazidsensitiven Na⁺-Cl⁻-Kotransporters der Maus, das die Membrandomänen 1-7 umfaßt [Obermüller et al. 1995]; ein 375 bp langes cDNA-Fragment des bumetanidsensitiven Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Kotransporters der Maus, welches mit dem Aminosäureabschnitt 61-188 korrespondiert [Obermüller et al. 1996]; und ein 248 bp langes cDNA-Fragment der NAD-abhängigen 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ2 der Ratte [Bostanjoglo et al. 1998]. Im Falle der 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase wurde die cDNA innerhalb des Plasmids als Matrice für die Transkription benutzt, nachdem das Plasmid vorher unter Verwendung von HindIII oder BamHI (Boehringer, Mannheim) linearisiert worden war.

Als Matrize zur Transkription der anderen Proben wurde statt des linearisierten Plasmids ein PCR-Produkt hergestellt. Dieses umfaßte den jeweiligen einklonierten cDNA-Abschnitt und die plasmideigenen Transkriptionspromotoren und wurde mittels PCR unter Verwendung von vektorspezifischen Primern synthetisiert. Durch Extraktion mittels Phenol/Chloroform und Lithium-Chlorid/Ethanol-fällung (4 M LiCl/ 100% Ethanol) wurde die DNA aufgereinigt. Zur Qualitätskontrolle und zur Quantifizierung der DNA wurden Agarosegel-Elektrophoresen (Seakem-ME Agarose, FMC, USA) und photometrische Bestimmungen (GeneQuantII, Pharmacia Biotech) durchgeführt.

3.3.1.2 In vitro-Transkription zur Herstellung Digoxigenin-markierter Riboproben

Die in vitro-Transkription zur Herstellung markierter RNA-Proben wurde mit Hilfe einer T3 Polymerase bzw. einer T7 Polymerase (Boehringer, Mannheim) unter Verwendung von Digoxigenin-markiertem Substrat durchgeführt. Bei der Herstellung jeder Probe wurden in verschiedenen Ansätzen beide Polymerasen verwendet, so daß durch die komplementäre Leserichtung der Enzyme jeweils eine Antisense- und eine Sense-RNA-Probe entstand. Die Antisenseprobe, die das komplementäre Gegenstück zur zellulären mRNA bildet, diente als Nachweis für Proteinexpression, während die Sense-Probe als Kontrollsonde benutzt wurde.

Für die Transkription wurde jeweils 1 µg des linearisierten Plasmids bzw. 0,3 µg des PCR-Produktes als Matrize eingesetzt und zusammen mit 13 µl Diethyl-Pyrocbonat (DEPC, Sigma, St. Louis, USA) behandeltem H₂O, 2 µl Transkriptionspuffer (Boehringer, Mannheim), 2 µl Nukleotidgemisch mit Digoxigenin-markiertem Uridin 5'-Triphosphat (DIG-Labeling Mix; Boehringer, Mannheim) und 2 µl der jeweiligen RNA-Polymerase (Boehringer, Mannheim) für 2 ¼ Std. bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte der Verdau der DNA-Matrize in einer ¼ -ständigen Inkubation mit RNase freier DNase (Boehringer, Mannheim). Die RNA wurde mit Lithium-Chlorid und 100% Ethanol gefällt, mit 80% Ethanol gewaschen und nach anschließendem Trocknen in 100 µl DEPC-H₂O

aufgenommen. Um die RNA zu quantifizieren und die Güte des Transkriptionsproduktes zu beurteilen, wurden photometrische Bestimmungen und Agarosegel-Elektrophoresen durchgeführt.

Da die Zugänglichkeit zellulärer mRNA für lange Riboproben eingeschränkt ist, wurden die

markierten Riboproben für NaPi2 und NCC nach erfolgter Transkription durch alkalische Hydrolyse gekürzt. Hierzu wurden 50 µl gelöstes Transkript mit einem Carbonatpuffergemisch (20 µl 0,2 M NaHCO₃/30 µl 0,2 M Na₂CO₃) bei 60°C inkubiert. Die Inkubationsdauer wurde entsprechend der Ausgangslänge der Riboprobe berechnet (NCC 33 Min.; NaPi2 37 Min.). Die Fällung der hydrolysierten RNA erfolgte analog zur Fällung der Transkripte (s.o.).

3.3.1.3 Hybridisierung Digoxigenin-markierter Riboproben

Für die In situ-Hybridisierung wurden Gefrierschnitte von 7 µm Dicke verwendet. Die Gefrierschnitte wurden an einem CM3000 Kryostat (Leica) hergestellt, auf silanisierte (1% Aminopropyltriethoxysilan in H₂O, Sigma, St. Louis, USA) Objektträger aufgebracht und für 15 Min. in eisgekühltem 4% Paraformaldehyd (in PBS, pH 7,4) nachfixiert. Nach mehreren Waschschritten (3x 5 Min. PBS; 2x 5 Min. H₂O; 2x 5 Min. PBS) und einem Deproteinierungsschritt (10 Min. 0,1 M HCl) wurden die Schnitte für 20 Min. in 0,25% Essigsäure (T.J.Baker, Holland)/0,1 M Triethanolamin (Sigma, St. Louis, USA) inkubiert. Es folgten zwei weitere 5-minütige Waschschrritte in PBS und die Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (jeweils 5 Min. in 70%, 80% und 96% Ethanol). Nachdem die Schnitte für 20 Min. bei Raumtemperatur luftgetrocknet worden waren, wurden sie mit einem Prähybridmix (50% deionisiertes Formamid [Merck, Darmstadt], 40 mM Tris-HCl [Trometamol, Merck, Darmstadt/HCl; pH 7,4], 25 mM EDTA [Roth, Karlsruhe], 20 mM NaCl, 0,25 mg/ml tRNA, 2,5x Denhardt-Lösung [100 x = 0,05% Ficoll, 0,05% Polyvinylpyrrolidon und 0,05% bovines Serumalbumin], alle Produkte – soweit nicht anders angegeben - von Boehringer, Mannheim) bedeckt, und für 1-2 Std. bei 40°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Entfernen des Prähybridmix wurden die Schnitte mit dem Hybridmix (50% deionisiertes Formamid, 200 mM Tris-HCl [pH 7,4], 1 mM EDTA [pH 8], 0,2 M Dithiothreitol [Biomol, Hamburg], 0,33 M NaCl, 5 mg/ml tRNA, 1 mg/ml Heringsperma [beides Boehringer, Mannheim], 10x Denhardt-Lösung, 10% Dextransulfat [Sigma, St. Louis, USA], mit 2-8 pg Digoxigeninmarkierter Riboprobe [die optimale Sondenkonzentration wurde für jede Riboprobe ausstitriert]) überschichtet. Es wurden jeweils Sense- und Antisense-Hybridisierungen durchgeführt. Um eine Austrocknung der Schnitte zu verhindern wurden sie mit silikonisierten (Sigmacote, Sigma, St. Louis, USA) Deckgläschen bedeckt und für 18-20 Std. bei 40°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Für die parallele Detektion von NKCC2- und NaPi2-mRNA wurden die entsprechenden Riboproben im selben

Hybridmix, dessen Zusammensetzung ansonsten unverändert blieb (s.o.), eingesetzt.

3.3.1.4 Entfernen nicht hybridisierter Riboproben

Die silikonisierten Deckgläschen wurden in einer Natriumzitratlösung (2x Standard Sodium Citrat, SSC = 18% NaCl/15% Na-Citrat [beides Merck, Darmstadt]) abgelöst und die Schnitte für 30 Min. in derselben Lösung bei 40°C gewaschen. Es folgten weitere Waschschrte in verschiedenen Waschlösungen bei unterschiedlichen Temperaturen (30 Min. in 0,38x SSC/50% deionisiertes Formamid und 1 Std. in 0,1x SSC/50 % deionisiertes Formamid, beide Waschschrte bei 40°C; 2x 10 Min. in 0,5x SSC und 10 Min. in 0,2x SSC bei Raumtemperatur).

3.3.1.5 Detektion der hybridisierten Riboproben

Zur Detektion der hybridisierten Riboproben wurden die Schnitte nach einer ½ Std. Inkubation mit Blockier-Medium (1% Boehringer Blockierungsreagens, 0,5% Rinderserumalbumin in 100 mM Tris-HCl [pH 7,5]/150 mM NaCl gelöst), mit einem alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-Digoxigenin-Antikörper (Boehringer, Mannheim) in einer Verdünnung von 1:500 in Blockier-Medium beschichtet. Nach einer 1-2 stündigen Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Schüttelgerät wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C gelagert. Die enzymatische Farbentwicklung der Schnitte wurde unter Verwendung eines Entwicklungspuffers nach Boehringer (enthält Nitroblau Tetrazolium und 5Bromo-4Chloro-3Indolyl-Phosphat als Enzymsubstrate, sowie Levamisol [Sigma, St. Louis, USA] zur Hemmung endogener Phosphatasen; pH 9,5) unter Lichtabschluss bei 4°C oder bei Raumtemperatur durchgeführt und in Abhängigkeit von der angestrebten Intensität der Nachweisreaktion nach 4-48 Std. abgestoppt. Nachdem die Schnitte 2x 15 Min. in Tris-puffer (100 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) gewaschen worden waren, folgten 2 weitere Waschschrte für jeweils 15 Min. in PBS. Abschließend wurden die Schnitte mit 50% Glycerin (Merck, Darmstadt)/PBS eingedeckt und an einem Leica DMRB Mikroskop mit Interferenzkontrastlicht ausgewertet.

3.3.2 Autoradioaktiv markierte In situ-Hybridisierung

Nachdem der Nachweis von rENaC-mRNA mit der Methode der nonradioaktiven In situ-Hybridisierung trotz mehrfacher Versuche nicht gelungen war, wurde die In situ-Hybridisierung für rENaC mit (^{35}S)-markierten Riboproben zusammen mit M. Fey und Prof. Dr. N. Farman, INSERM U 246, in Paris durchgeführt.

3.3.2.1 *Präparation der cDNA-Matrizen*

Die cDNAs für die Herstellung (^{35}S)-markierter Riboproben für die β - und die γ - Untereinheit des Amilorid-sensitiven Na^+ -Kanals entsprachen der 3' untranslatierten Region der jeweiligen mRNA aus der Rattenniere (Nukleotide 2150-2463 für die β -Untereinheit und 2470-2911 für die γ -Untereinheit) [Duc et al. 1994]. Die cDNAs waren in den pBluescript KS⁺ Vektor subcloniert, wurden mit BamHI oder KpnI (Stratagene) linearisiert und wie unter 3.3.1.2 beschrieben aufgereinigt.

3.3.2.2 *In vitro-Transkription zur Herstellung (^{35}S)-markierter Riboproben*

Die Transkription erfolgte nach einem Protokoll analog zu 2.3.1.2, unter Verwendung von einem Transkriptions-Kit (Promega) und von (^{35}S)-markiertem Uridin 5'-Triphosphat (^{35}S -UTP, 1000 Ci/mmol; Amersham, USA). Die Bestandteile der Transkriptionslösung wurden mittels Ausschlußchromatographie (Nick Column, Sephadex G200, Pharmacia, Uppsala, Schweden) aufgetrennt und die RNA durch Ethanol-Präzipitation gefällt. Anschließend wurde der Erfolg der Inkorporation von (^{35}S)-UTP anhand der Strahlungsaktivität der Riboproben in einem Szintillationszähler kontrolliert.

3.3.2.3 Hybridisierung (³⁵S)-markierter Riboproben

Gefrierschnitte (7 µm) wurden 20 Min. in 4% Paraformaldehyd nachfixiert, 2x 5 Min. in PBS gewaschen, für 7,5 Min. mit Proteinase K (19µg/ml; Sigma, St. Louis, USA) behandelt. Anschließend wurden die Schnitte 5 Min. in 4% Paraformaldehyd nachfixiert, für einige Sek. in H₂O gespült, 10 Min. mit 0,25% Acetanhydrid (T.J.Baker, Holland) in Triethanolamin (pH 8) acetyliert, je 5 Min. mit PBS und 145 mM NaCl gewaschen und anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 85%, 95%, 2x 100%) entwässert. Nach einer Std. Lufttrocknung wurden die Schnitte mit einem Hybridisierungsgemisch beschichtet, das aus 50% Formamid, 1 mM DTT, 2x SSC, 10% Dextransulfat, 1mg/ml Lachssperma-DNA (Sigma, St. Louis, USA), und der jeweiligen (³⁵S)-markierten Riboprobe bestand. Pro Objektträger wurden zwischen 2,4 und 3,2x 10⁶ Szintillationszähleinheiten/Min. appliziert. Es wurden jeweils Sense- und Antisense-Hybridisierungen durchgeführt. Die Schnitte wurden durch Abdecken mit Parafilm vor Austrocknung geschützt und bei 50°C über Nacht inkubiert.

3.3.2.4 Entfernen nicht hybridisierter Riboproben

Nach einem ersten Waschschrift in 5x SSC/10 mM DTT für 20 Min. bei 50°C wurde der Parafilm mit einer Kanüle vorsichtig von den Schnitten entfernt. Ein hochstringenter Waschschrift über 20 Min. in 50% Formamid/2x SSC/10 mM DTT bei 65°C war gefolgt von zwei 10-minütigen Waschschriften bei 37°C in 0,5 M NaCl/5 mM EDTA [pH 8]/10 mM Tris-HCl [pH 7,5]. Zum Verdau nicht-hybridisierter Riboproben wurde anschließend bei 37°C eine 20-minütige Inkubation mit RNase (Sigma, St. Louis, USA) durchgeführt, wonach die Schnitte noch einmal 30 Min. bei 37°C in derselben NaCl/EDTA/Tris-HCl-Lösung gewaschen wurden. Nach einem abschließenden Waschschrift für 15 Min. bei Raumtemperatur in 0,1x SSC wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert (Konzentrationen wie am Vortag) und danach luftgetrocknet.

3.3.2.5 Detektion der hybridisierten Sonden

Für die autoradiographische Entwicklung wurden die Objektträger unter Lichtabschluß mit einer 50%-wäßrigen NTB-2 Emulsion (Eastman, Kodak, Rochester, USA) bedeckt und für zwei Wochen bei -20°C exponiert. Danach wurden die Signale mit D-19 Entwickler (Kodak, Rochester, USA) entwickelt und mit Unifix (Kodak, Rochester, USA) fixiert. Nach einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (Sigma, St. Louis, USA) wurden die Schnitte mit Eukitt eingedeckt und mikroskopisch mit Durchlicht oder Auflicht analysiert.

3.4 Immunhistochemie

3.4.1 Verwendete Primärantikörper

Die polyklonalen Antikörper, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, sind bereits eingesetzt und charakterisiert worden. Der Antikörper gegen NCC (freundlichsten überlassen von Prof. Dr. D. Ellison, Denver, USA) war gegen ein Fusionsprotein, welches das gesamte N-terminale Ende des NCC der Maus umfaßte, generiert worden [Bostanjoglo et al. 1998]. Der Antikörper gegen 11HSD (freundlichsten überlassen von Dr. B. Reeves, New Haven, USA) war gegen ein Fusionsprotein generiert worden, welches mit dem humanen 11HSD korrespondiert [Bostanjoglo et al. 1998, Kyosseff et al. 1996]. Für die Herstellung der Antikörper gegen die drei Untereinheiten von rENaC (freundlichsten überlassen von Prof. Dr. B. Rossier, Lausanne, Schweiz) waren Fusionsproteine des N-terminalen Endes von α -rENaC und des C-terminalen Endes von β - und γ -rENaC verwendet worden [Duc et al. 1994]. Dabei wurde die stärkste Immunreaktivität mit dem Antikörper gegen die β -Untereinheit erzielt. Alle genannten Antikörper waren im Kaninchen erzeugt worden, während der Antikörper gegen NaCa (freundlichsten überlassen von Dr. R. Reilly, Denver, USA) im Meerschweinchen gegen ein Fusionsprotein des Kaninchen-NaCa hergestellt worden war [Reilly et al. 1993]. Die Antikörper gegen NaCa und rENaC wurden in einer Verdünnung von 1:100, der Antikörper gegen NCC in einer Verdünnung von 1:200 und der Antikörper gegen 11HSD in einer Verdünnung von 1:200-1:1000 eingesetzt. Der Antikörper gegen erythrozytäre Bande 3, (freundlichsten überlassen von Dr. Jöns, Berlin) diente als Kontrollmarker für Schaltzellen Typ A [Alper et al. 1989, Madsen et al. 1992] und wurde in einer Verdünnung von 1:3000 verwendet.

3.4.2 Antikörperinkubation und Antikörperdetektion

Für die Immunhistochemie wurden Gefrierschnitte einer Dicke von 4-7 µm verwendet. Die Gefrierschnitte wurden auf Chromgelatine-beschichtete (Kaliumchromsulfat-12-Hydrat, Riedel-de Haen) Objektträger aufgebracht, ca.1 Std. bei Raumtemperatur luftgetrocknet und anschließend zum Blocken unspezifischer Proteinbindungsstellen mit Blocking-Medium für ½ Std. bei Raumtemperatur in einer feuchten Inkubationskammer inkubiert. Als Blocking-Medium diente entweder 5% Milchpulver (Magermilch, Glücksklee) verdünnt in PBS oder 2% bovines Serum-Albumin in PBS. Nach Entfernen des Blocking-Mediums wurden die Schnitte mit den jeweiligen Primärantikörpern, die entsprechend den unter 3.4.1 angegebenen Konzentrationen in PBS verdünnt worden waren, überschichtet und für 1- 2 Std. bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C gelagert. Nach der Primärantikörperinkubation wurden die Schnitte sorgfältig gespült (3x 8 Min. in PBS) und mit den jeweiligen Sekundärantikörpern beschichtet.

Die verwendeten Sekundärantikörper waren entweder direkt fluoreszenzmarkiert oder waren Bestandteil des Peroxidase-Antiperoxidase Systems (PAP). An fluoreszenzmarkierten Antikörpern kamen Cy3-konjugiertes Ziege anti-Kaninchen IgG Serum, Verdünnung 1:250 in PBS, und Cy2-konjugiertes Ziege anti-Meerschweinchen IgG Serum, Verdünnung 1:60 in PBS (beide Antikörper von DIANOVA, Hamburg) zum Einsatz.

Nachdem die ungebundenen Antikörper nach 1 Std. Inkubation durch 3x 5 Min. Waschen in PBS entfernt worden waren, wurden die Schnitte mit PBS/Glycerin (pH 8,6) eingedeckelt und fluoreszenzmikroskopisch (Leica DMRB mit Auflicht-Fluoreszenzzusatz) analysiert und fotografiert.

Das verwendete PAP-System bestand aus einem Schwein Anti-Kaninchen IgG Serum, mit dem die Schnitte für 30 Min. in einer Verdünnung von 1:20 in PBS inkubiert wurden und dem PAP-Komplex (Kaninchen Anti-Peroxidase IgG Serum plus Peroxidase), mit dem die Schnitte für weitere 30 Min. in einer Verdünnung von 1:100 inkubiert wurden (beide Präparate von DAKO, Glostrup, Dänemark). Das enzymatische Signal wurde mit 0.1% Diaminobenzidin (Sigma, St. Louis, USA) und 0,02% H₂O₂ (Merck, Darmstadt) in PBS generiert. Die Schnitte wurden mit Eukitt eingedeckelt.

Kontrollen wurden bei jedem Experiment durch den Austausch des Primärantikörpers mit Praeimmunserum (für die Antikörper gegen NCC und rENaC) oder mit PBS (für die

Antikörper gegen NaCa und 11HSD) durchgeführt.

3.5 Kombinierte In situ-Hybridisierung und Immunhistochemie

Sollte der Nachweis von mRNA mittels In situ-Hybridisierung mit einem immunhistochemischen Nachweis kombiniert werden, so wurde zuerst die In situ-Hybridisierung bis zum Schritt der Inkubation mit dem Antikörper-Blocking-Medium, wie oben beschrieben, durchgeführt. Im folgenden wurde der Anti-Digoxigenin-Antikörper zusammen mit dem jeweiligen Proteinantikörper appliziert. Nach einem Waschschrift (2x 15 Min. in PBS) wurde der Primärantikörper wie unter 3.4.2 beschrieben mit einem Sekundärantikörper fluoreszenzmarkiert. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion zum Entwickeln des In situ-Hybridisierungssignals gestartet.

Alternativ wurde der immunhistologische Nachweis im Anschluß an die abgeschlossene In situ-Hybridisierung, d.h. nachdem das In situ-Hybridisierungssignal bereits entwickelt war, durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Expression von NKCC2 und NaPi2

Vom adulten Nephron ist bekannt, daß NKCC2 in Tubuluszellen entlang des gesamten TAL, einschließlich der Macula densa (MD) und des kurzen post-Macula Segmentes exprimiert wird [Obermüller et al. 1996].

Während der ersten postnatalen Tage waren die zuletzt induzierten Nephrone direkt unterhalb der Nierenkapsel frei von Signal für NKCC2-mRNA (Abb. 3 a). Am 8. Tag post partum hingegen, zu einem Zeitpunkt, an dem die Formation neuer Nephrone abgeschlossen ist, waren direkt subkapsulär gelegene Tubulussegmente mit starker NKCC2-Expression zu erkennen (Abb. 3 a'). Die früheste Expression von NKCC2 wurde in Nephronen des Stadiums III in solchen Tubuluszellen gefunden, deren direkte Nachbarschaft zum korrespondierenden Glomerulum ihre Natur als zukünftige MD Zellen andeutete (Abb. 4 a, c). Während die Feinstruktur dieser Zellen zu Beginn der NKCC2-Expression noch sehr undifferenziert war, folgte in der sich anschließenden Entwicklungsphase eine schnelle Ausdifferenzierung der MD Zellen (Abb. 4 b, d, s.u. Abb. 5 d-f). Mit Elongation der Henle'schen Schleife im frühen Stadium IV, nahm die NKCC2-Expression innerhalb der MD Region an Intensität zu und breitete sich entlang des aufsteigenden Schenkels der Schleife – also entgegengesetzt zur zukünftigen Flußrichtung – aus (Abb. 5 a, b, c). Während dieses Vorgangs zeigte das Glomerulum bereits deutlich differenzierte Kapillarschlingen, deren Anzahl allerdings noch sehr begrenzt war (Abb. 5 d). Die ultrastrukturelle Morphologie der prospektiven MD-Zellen zeigte bereits frühzeitig charakteristische Merkmale der adulten Form. So waren basolaterale Membranauffaltungen innerhalb der MD-Zellen bereits zahlreich vorhanden (Abb. 5 e), während Tubuluszellen in direkter Nachbarschaft noch keine solchen Spezialisierungen aufwiesen (Abb. 5 g). Obwohl noch kein tubuläres Lumen entstanden war, imponierten am apikalen Pol der MD-Zellen desmosomale Verbindungskomplexe und Microvilli (Abb. 5 f).

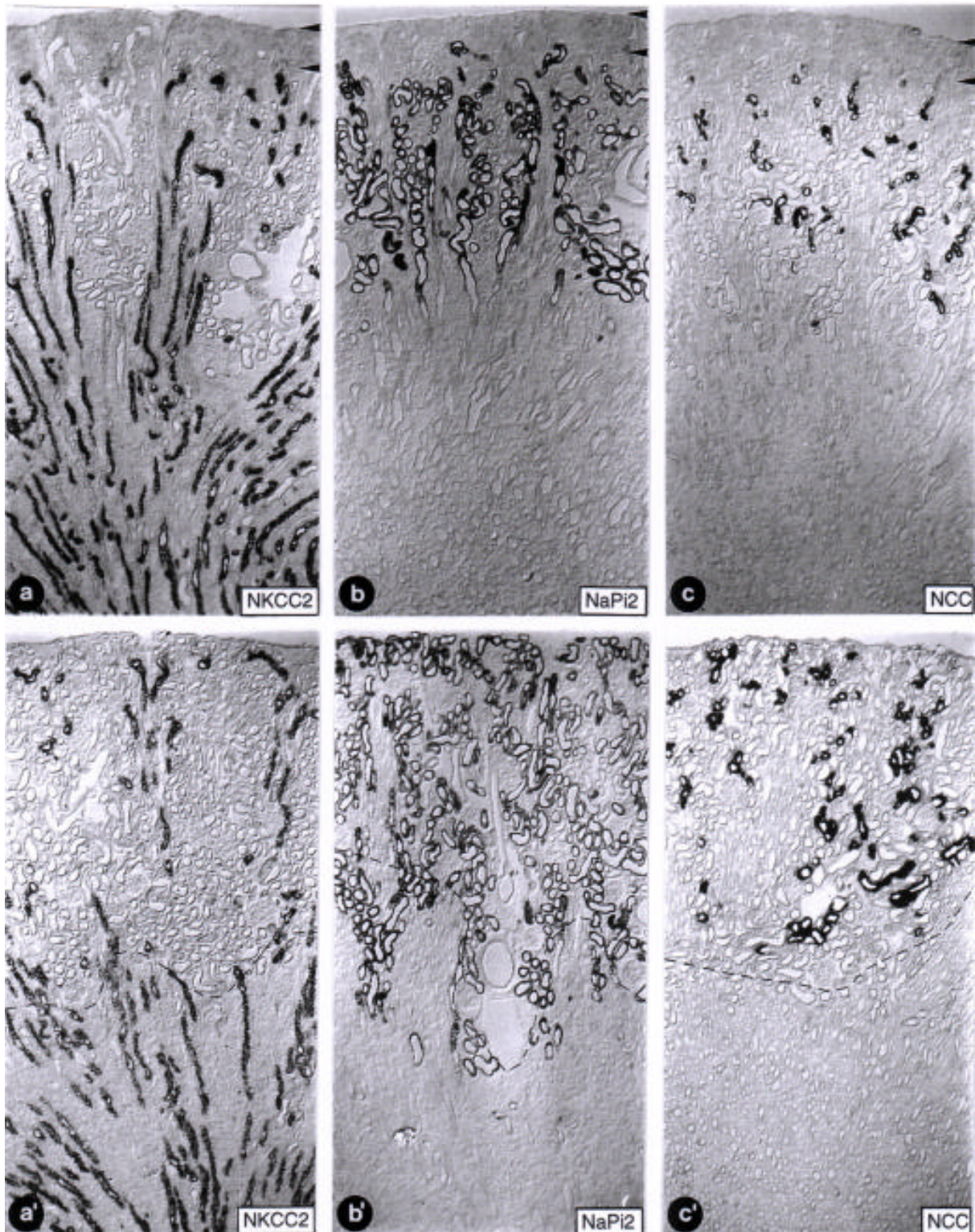


Abb. 3: Übersichtsaufnahmen von In situ-Hybridisierungen mit Digoxigenin-markierten Riboproben für NKCC2 (a, a'), NaPi2 (b, b') und NCC (c, c'). Die Nieren sind 3 (oben) bzw. 8 (unten) Tage alt. Für keines der Proteine ist eine Expression direkt innerhalb der nephrogenen Zone (Pfeilspitzen) zu beobachten. Am 8. Tag, wenn die Formation neuer Nephrone abgeschlossen ist, ist mRNA-Signal für alle drei Proteine in Tubulusquerschnitten direkt unterhalb der renalen Kapsel sichtbar. Die kortiko-medulläre Grenze ist in den Nieren vom 8. Tag durch gestrichelte Linien markiert. Vergrößerungen: x 110

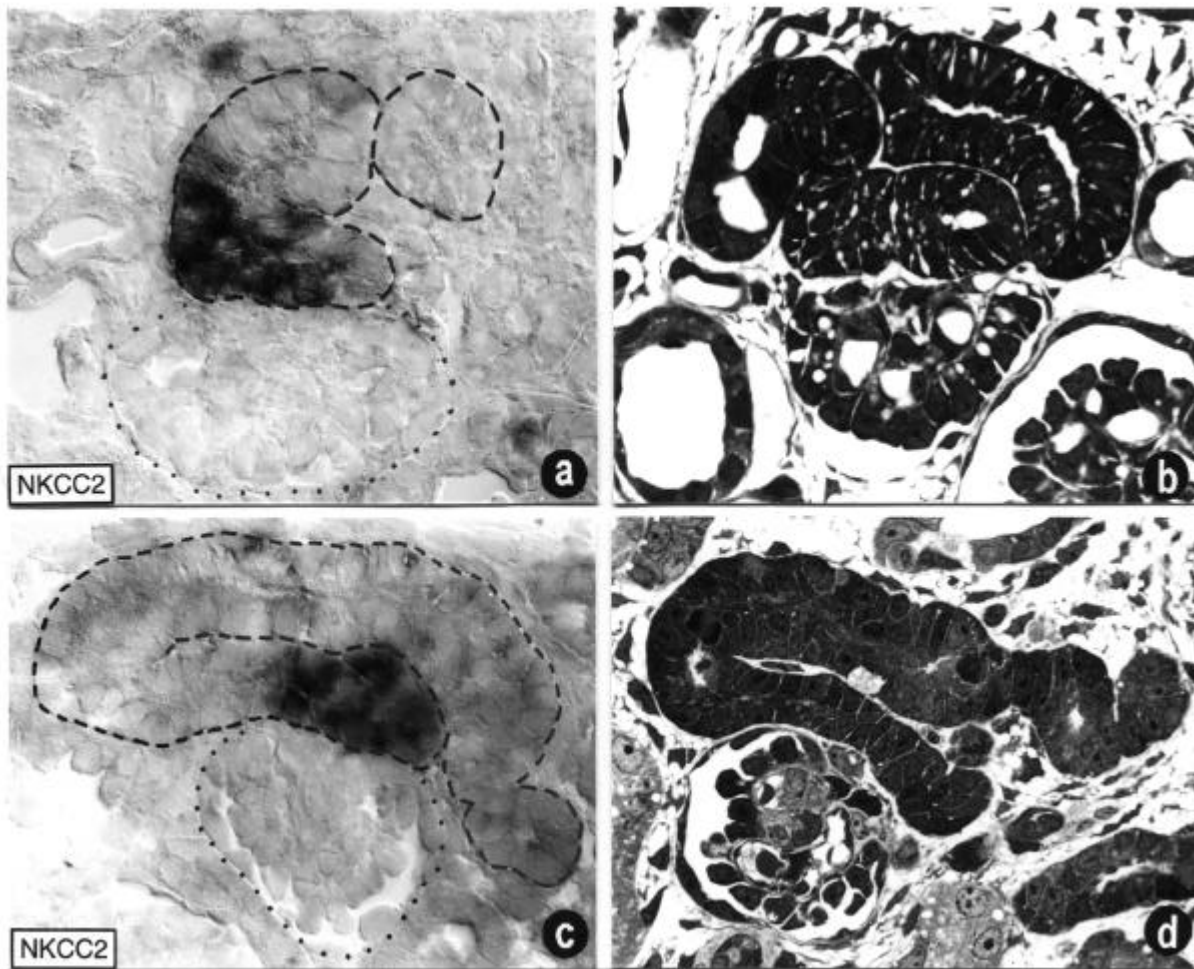


Abb. 4: Mittels In situ-Hybridisierung ist die Expression von NKCC2 in juxtaglomerulären Zellen von Nephronen im frühen Stadium III (a) und im fortgeschrittenen Stadium III (c) dargestellt. Entsprechende Stadien von Semidünnschnitten verdeutlichen die zunehmende Differenzierung des Nephrons (b, d). Vergrößerungen: x 520.

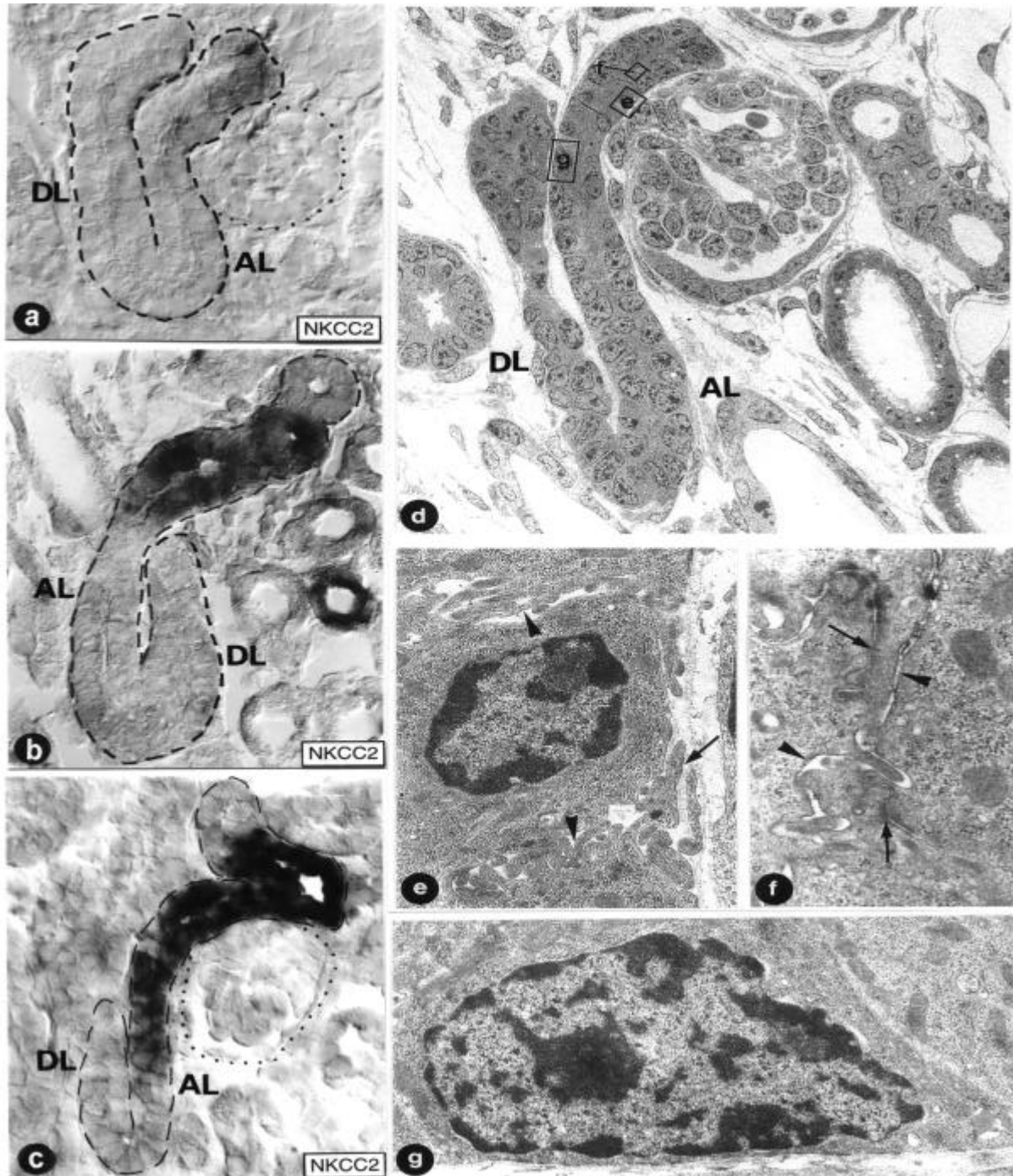


Abb. 5: Die Expression von NKCC2 in der sich entwickelnden Henle'schen Schleife ist durch In situ-Hybridisierung demonstriert. Während die Henle'sche Schleife im frühen Stadium IV auswächst, nimmt die Signalintensität für NKCC2 in den MD-Zellen zu (a, b) und das Signal beginnt sich entlang des aufsteigenden Schenkels der Henleschen Schleife auszudehnen (c); (AL = aufsteigender Schenkel; DL = absteigender Schenkel der Henleschen Schleife). Die Expression endet einige Zellen distal der MD-Region (c). Die elektronenmikroskopische Darstellung d zeigt die ultrastrukturelle Morphologie einer analogen Henle'schen Schleife im frühen Stadium IV. Im Ausschnitt e ist die basolaterale Membranspezialisierung der MD dargestellt, während g das Fehlen solcher Membranspezialisierung im unreifen aufsteigenden Schenkel der Henleschen Schleife demonstriert. Luminal fallen in den Zellen der MD-Region primitive Microvilli und desmosomale Komplexe auf (f). Vergrößerungen: x 520 (a, b), x 480 (c), x 580 (d), x 71.000 (e) und x 11.100 (e, g).

Zur vergleichenden Analyse des Entwicklungsstandes des PT wurde die Expression von NaPi2 untersucht. Im adulten Nephron wird NaPi2 entlang des gesamten PT einschließlich des gestreckten Teils des proximalen Tubulus (PST = proximal straight tubule) exprimiert, wobei eine Zunahme in der Expressionsintensität vom äußeren Kortex in Richtung Medulla nachgewiesen wurde [Custer et al. 1994].

Während der Nephrogenese zeigten sich erste Zeichen von NaPi2-Expression in Nephronen des fortgeschrittenen Stadiums III, die sich direkt unterhalb der nephrogenen Zone befanden (Abb. 3 b). Ein kortikomedullärer Gradient in der Expressionsstärke wie bei der adulten Niere war zuerst nicht erkennbar, begann sich aber am 8.Tag post partum abzuzeichnen (Abb. 3 b'). Auf Einzelnephronebene wurde die initiale Expression von NaPi2 zuerst in geringer Intensität innerhalb des unreifen proximalen Konvoluts lokalisiert (Abb 6 a). In der Gegenüberstellung zum DT fiel auf, daß die Expression von NKCC2 in Zellen der MD-Region analoger Stadien schon relativ stark war (Abb. 6 c). Während sich in Stadium IV der typische Bürstensaum im PT zu bilden begann, nahm die Expressionstärke von NaPi2 sukzessive zu und dehnte sich auch auf die zunächst signalnegativen, am glomerulären Harnpol gelegenen proximalen Zellen des PT aus (Abb. 6 b). Zum genaueren Vergleich der zeitgleichen Expression von NaPi2 und NKCC2 wurden Riboproben für beide Proteine parallel appliziert. Dabei bestätigte sich eine im Vergleich zur proximalen NaPi2-Expression protrahierte Expression von NKCC2 im aufsteigenden Schenkel der Henle'schen Schleife und speziell in den Zellen der MD. So herrschte im primitiven PT des frühen Stadiums IV typischerweise ein schwaches NaPi2-Signal vor, während die MD-Region desselben Nephrons eine signifikante NKCC2-Expression präsentierte (Abb. 6 f). Zu diesem Zeitpunkt, aber auch noch lange während des anschließenden Auswachsens der Henle'schen Schleife, endete das NaPi2-Signal am Übergang des proximalen Konvoluts in den absteigenden Schenkel der Henle'schen Schleife (Abb. 7 a). Der auswachsende PST blieb lange Zeit frei von Signal. Erst im bedeutend fortgeschrittenen Stadium IV, als der sich spät entwickelnde, dünne Teil der absteigenden Henle'schen Schleife bereits morphologisch abgrenzbar wurde, lies sich eine NaPi2-Transkription im PST nachweisen (Abb. 7 b, c).

Die Expression von NKCC2 im TAL dehnte sich entgegengesetzt der zukünftigen tubulären Stromrichtung kontinuierlich aus (Abb. 7 d, e), bis das mRNA-Signal schließlich nicht nur im

gesamten aufsteigenden Schenkel der Henle'schen Schleife, sondern auch in der U-förmigen Schleifenbiegung zu finden war (Abb. 7 f). Die Biegungen der längsten Schleifen reichten am ersten Tag post partum bis in die Papillenregion, so daß im prospektiven inneren Nierenmark NKCC2-mRNA nachgewiesen werden konnte. Der dünne Abschnitt der aufsteigenden Henle'schen Schleife, ohne NKCC2-Expression, wie er in langen Henle'schen Schleifen der adulten Niere gefunden wird, differenzierte sich erst spät, offenbar aus dem zuvor bereits NKCC2-exprimierenden TAL-Gewebe. Distal reichte die Ausdehnung der NKCC2-Expression während der Entwicklung konstant bis einige Zellen hinter die MD an den Übergang in den DCT (Abb. 5 c, 8 a).

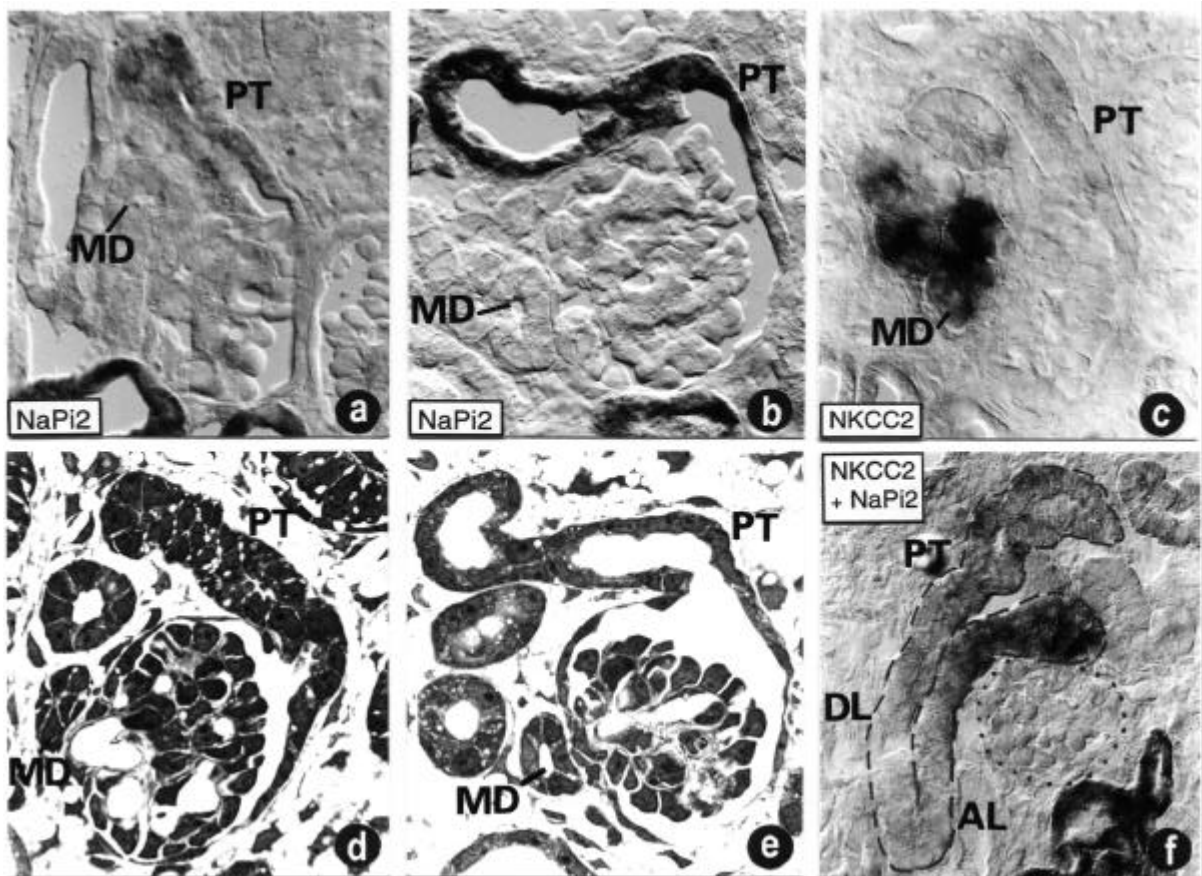


Abb. 6: Initiale, schwache NaPi2-Expression im typischerweise zunächst kapselwärts ausgerichteten primitiven proximalen Konvolut von Nephronen des späten Stadiums III (a), dargestellt durch In situ-Hybridisierung. Zu beachten ist, daß in MD-Zellen analoger Stadien bereits ein starkes NKCC2-Signal vorhanden ist (c). Die proximalen Tubuluszellen am Urinpol des Glomerulums sind zunächst frei von NaPi2-Signal (a), aber beginnen sobald sich ein deutliches Lumen im PT etabliert hat, mit der Expression (b). In d und e sind morphologisch analoge Stadien zu a und b als Semidünnschnittpräparate dargestellt. Die parallele Applikation von Riboproben für NKCC2 und NaPi2 in f veranschaulicht, die frühere Expression von NKCC2 in prospektiven MD-Zellen, im Vergleich zur schwachen NaPi2-Expression im PT, Vergrößerungen: x 580 (a-e), x 520 (f).

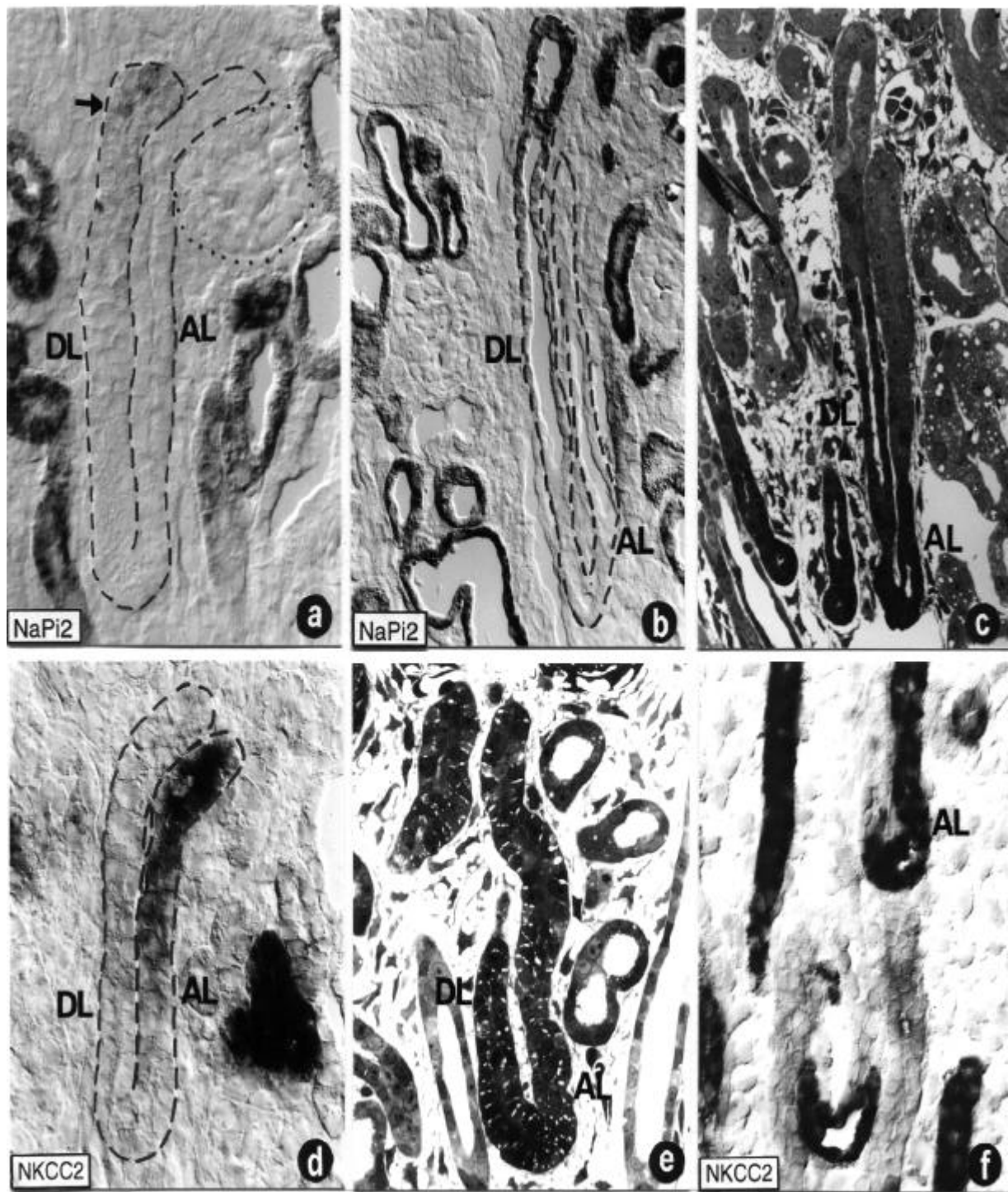


Abb. 7: In a ist ein Nephron im fortgeschrittenen Stadium IV dargestellt, in dem sich das Ende der schwachen Expression von NaPi2 am Übergang in den DL durch In situ-Hybridisierung lokalisieren läßt (Pfeil in a). Mit dem Auswachsen der Henle'schen Schleife und der Differenzierung eines dünnen epithelialen Teils des absteigenden Schenkels dehnt sich das NaPi2-Signal sukzessive in den DL aus (b). Die analoge Morphologie zu b ist als Semidünnschnitt in c dargestellt. Das Signal für NKCC2 nimmt im fortgeschrittenen Stadium IV bereits einen großen Teil des AL ein (d), dazu analoges Stadium als Semidünnschnitt in (e). Die U-förmigen Biegungen der Henle'schen Schleifen zeigen die Expression von NKCC2 im inneren Markbereich einer Niere vom 1. Tag post partum (f). Vergrößerungen: x 480 (b, c), x 520 (a, d, e, f).

4.2 Expression von NCC und NaCa

Im adulten Nephron wird NCC von Tubuluszellen entlang des gesamten DCT exprimiert. Die Expression beginnt hinter dem NKCC2-positiven post-Macula Segment und erstreckt sich bis zum Übergang des DCT in den CNT [Obermüller et al. 1995]. Für den reifen DCT ist eine Unterteilung beschrieben, die zwischen einem proximalen DCT-Teil (DCT1) und einem distalen DCT-Teil (DCT2) unterscheidet [Bostanjoglo et al. 1998, Loffing et al. 1996]. Während der DCT1 Charakteristika aufweist, die für das distale Konvolut typisch sind, zeigt der DCT2 ein hybrides Bild, indem er zum einen Spezifitäten des DCT, zum anderen aber auch des CNT zeigt. So wird NCC im DCT1 alleine exprimiert, dagegen im DCT2 zusammen mit NaCa, der im übrigen typisch für den Ratten-CNT ist [Reilly et al. 1993, Obermüller et al. 1995].

Zum Zeitpunkt der initialen Expression von NCC befanden sich die Nephrone im frühen Stadium IV, womit die Expression von NCC in einem späteren Stadium startete als die von NKCC2 oder NaPi2. Diese Beobachtung spiegelte sich auch darin wider, daß die Nephrone, in denen ein initiales mRNA-Signal für NCC zu finden war, weiter von der nephrogenen Zone entfernt lagen als jene, die NKCC2 oder NaPi2 initial exprimierten (Abb.3 c). Dieser "Rückstand" hatte sich am 8.Tag ausgeglichen, so daß auch in direkt subkapsulär gelegenen Tubulussegmenten starke NCC-Expression vorhanden war (Abb. 3 c'). NCC wurde sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene untersucht. Mit dem initialen Auftreten von NCC-mRNA ging eine positive NCC-Proteinimmunreaktion einher, deren Signal sich am apikalen Zellpol konzentrierte.

Während der frühen NCC-Expression schien der distale Anteil des DCT meist eine höhere Expressionsintensität als der proximale Teil aufzuweisen. Um diese Beobachtung, die auf einen Expressionsstart im distalen DCT hindeutete, zu überprüfen, wurden Doppelmarkierungen mit NCC-Antikörpern und NKCC2-Riboprobe durchgeführt. Aus den Doppelmarkierungen ging hervor, daß der Tubulusabschnitt distal des NKCC2-exprimierenden post-Macula Segmentes, im Gegensatz zu der adulten Situation, lange Zeit NCC-negativ bleibt (Abb. 8 a, a'). Diese Beobachtung zeigt zum einen, daß die initiale Expression von NKCC2 in der MD-Region nicht nur früher stattfindet als die von NaPi2 im PT, sondern auch früher als die von

NCC im proximalen DCT. Zum anderen wird die Vermutung gestützt, daß die erste Expression von NCC tatsächlich im distalen Teil des DCT startet. Der Beginn des DCT war nämlich selbst dann noch frei von NCC-mRNA und auch von Protein, als sich die Nephrone schon im fortgeschrittenen Stadium IV befanden, zu einem Zeitpunkt also, zu dem sie distal schon NCC exprimierten.

Später, im reiferen Stadium IV, hatte sich die NCC-Expression von distal entlang des gesamten DCT nach proximal ausgedehnt, so daß sowohl NCC-mRNA, als auch NCC-Protein über die ganze Ausdehnung des DCT gleichzeitig demonstriert werden konnte. Das Signal begann distal des aufsteigenden Schenkels der Henle'schen Schleife und erstreckte sich bis in den Übergang zum CNT (Abb. 8 c). In diesem Stadium wies die zugehörige Henle'sche Schleife im Regelfall bereits ein tubuläres Lumen auf, das TAL-Epithel war aber noch aus unreifen, kubischen Zellen aufgebaut, denen die im Adulten typische basale Streifung und die zellulären Interdigitationen weitgehend fehlten (Abb. 8 d). Zum Zeitpunkt der in den proximalsten Abschnitt des DCT ausgebreiteten NCC-Expression, wurde zunächst ein partielles Überlappen des luminalen NCC-Immunosignals mit NKCC2-In situ-Hybridisierungssignal im post-Macula Segment beobachtet (Abb. 8 e, e'). Im Gegensatz dazu war der proximale Expressionsbeginn von NCC in reiferen Stadien abrupt, und es bestand keine Überlappung mit NKCC2.

Als morphologischer Anhaltspunkt zur Beurteilung der distalen Ausdehnung der frühen NCC-Expression erwies sich vor allem jener Tubulusabschnitt, an dem sich aufeinanderfolgende CNT-Generationen zu Arkaden vereinigen, als bedeutsam (zur Mikromorphologie der Arkaden s. 6.2, Absatz 2). Die NCC-Signale jüngerer Tubulusgenerationen reichten anfangs bis in die Arkaden, d.h. bis in einen in der adulten Form als CNT definierten Bereich, hinein. In älteren Generationen nahm der proximal des Arkadenanfangs lokalisierte Tubulusabschnitt dann einen CNT-spezifischen Charakter an. Das Ende des NCC-Signals zog sich nach proximal zurück, und die anfangs schwache Immunreaktivität für NaCa nahm in diesem Bereich an Intensität zu (Abb. 9 a,a',c,c').

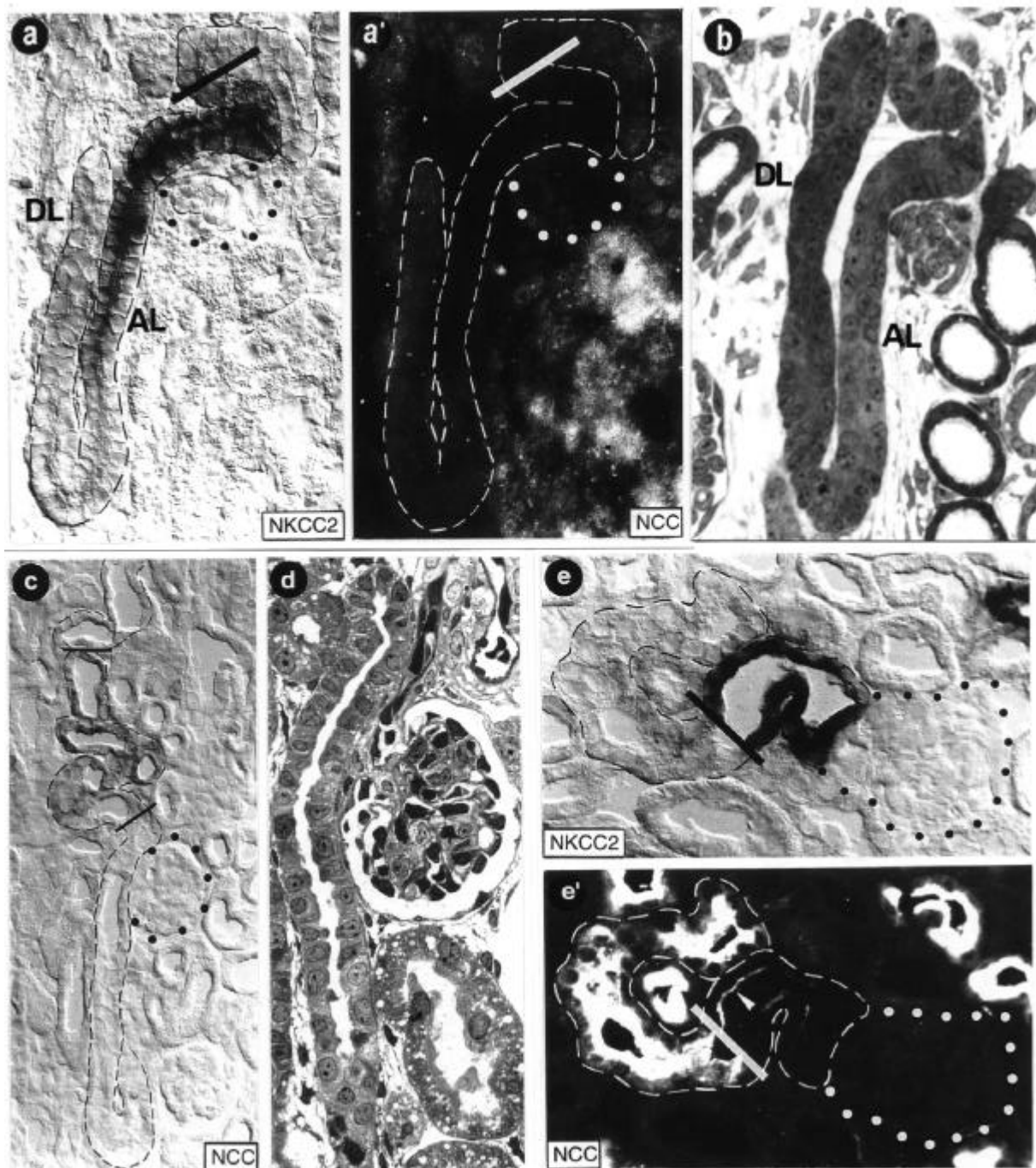


Abb. 8: Wie durch Doppelmarkierung mit NKCC2-Riboprobe und fluoreszenzmarkiertem Antikörper für NCC dargestellt, dehnt sich die Expression von NKCC2 im vorgeschrittenen Stadium IV aus (a), während das sich distal anschließende Tubulussegment unreaktiv für NCC bleibt (a'). Die analoge Morphologie ist als Semidünnschnittes in b dargestellt. C zeigt ein schwaches In situ-Hybridisierungssignal für NCC, das sich über die gesamte Länge des primitiven distalen Konvolutes erstreckt. Zu dieser Zeit besteht bereits ein tubuläres Lumen im AL, jedoch setzt sich das Epithel immer noch aus unreif-kubischen Zellen zusammen, denen die typischen Interdigitationen und die basale Streifung weitgehend fehlen (Semidünnschnitt, d). Im Übergangsbereich zwischen post macula-Segment und DCT (Grenze in e, e' mit einem Balken markiert) überlappt sich das mRNA-Signal für NKCC2 mit dem luminalen Immunosignal für NCC im späten Stadium IV (Pfeilspitze in e, e'). Vergrößerungen: x 520 (a, b, e, e'), x 400 (c), x 580 (d).

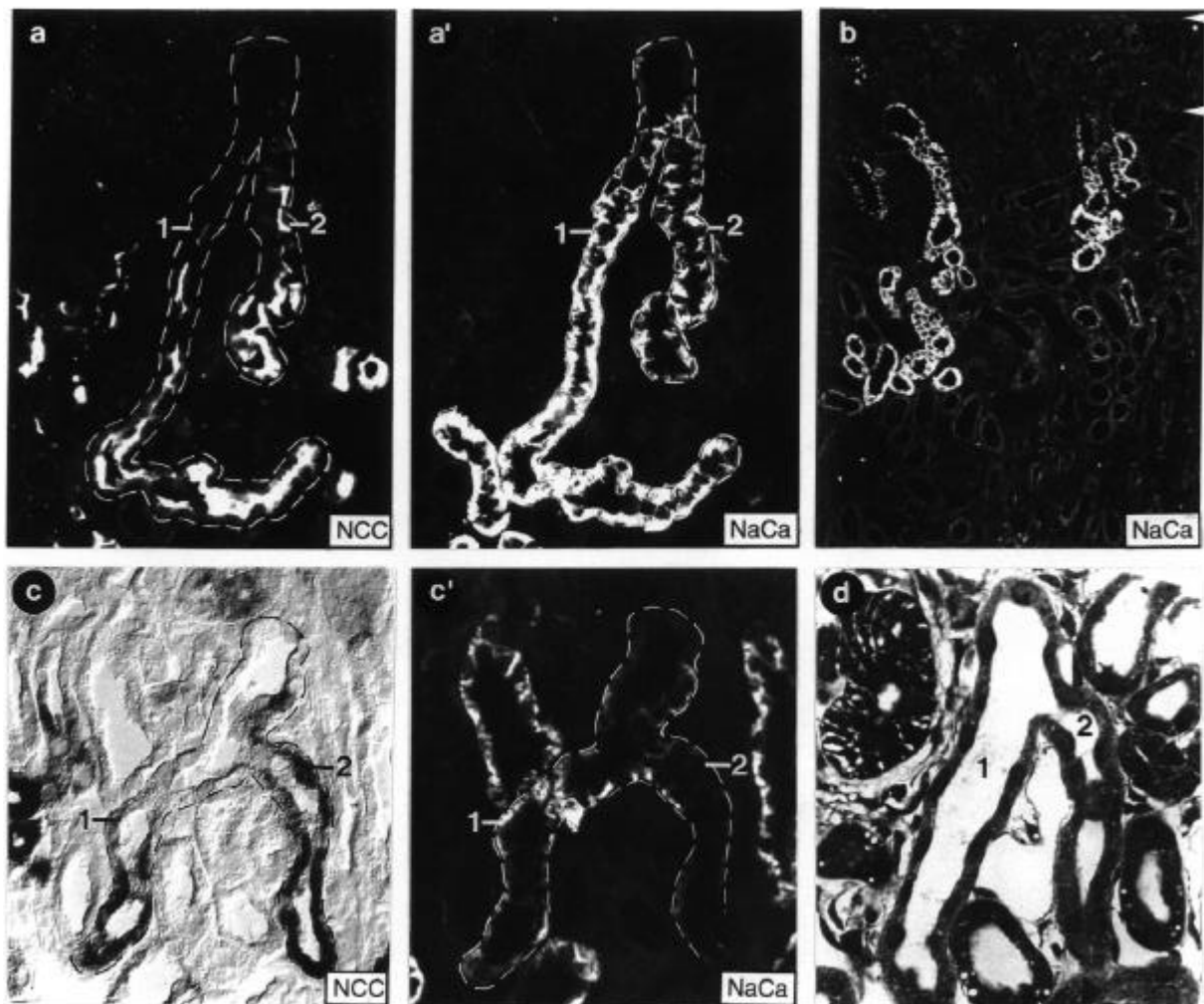


Abb. 9: Die Abbildungen a, a', c, c' und d zeigen aufeinanderfolgende CNT-Generationen, die zu einer Arkade fusionieren (ältere CNT sind mit 1, jüngere mit 2 gekennzeichnet). Die Komarkierung mit NCC-Antikörper und NaCa-Antikörper (a, a'), bzw NCC-Riboprobe und NaCa-Antikörper (c, c') zeigt, daß sich das NCC-Signal in jüngeren Generationen bis in die Arkade erstreckt (2), während es in älteren Generationen weiter proximal endet (1). Das NaCa-Signal nimmt parallel dazu in älteren CNT-Generationen an Intensität zu. (d) veranschaulicht in Analogie zu c, c' die Arkadenmorphologie als Semidünnschnitt. In b ist die typische Verteilung von NaCa immunreaktiven CNT an Tag 4 post partum dargestellt (die nephrogene Zone ist durch Pfeilspitzen markiert.) Vergrößerungen: x 420 (a, a'), x 240 (b), x 480 (c, c', d).

Eine Subsegmentierung des DCT in DCT1 und DCT2, wie sie für den adulten Tubulus typisch ist, war erst in Nephronen klar zu erkennen, die morphologisch bereits weitgehend ausdifferenziert waren. An das Ende des NKCC2-Signals schloß sich in Richtung stromabwärts ein abrupter Beginn von NCC-Immunreaktivität an. Es folgte ein Tubulusabschnitt variierender Länge, in dem das NCC-Signal ohne gleichzeitige NaCa-Immunreaktivität vorlag, während im Anschluß daran ein Segment folgte, dessen Epithel beide Signale in Kolokalisation aufwies (Abb. 10).

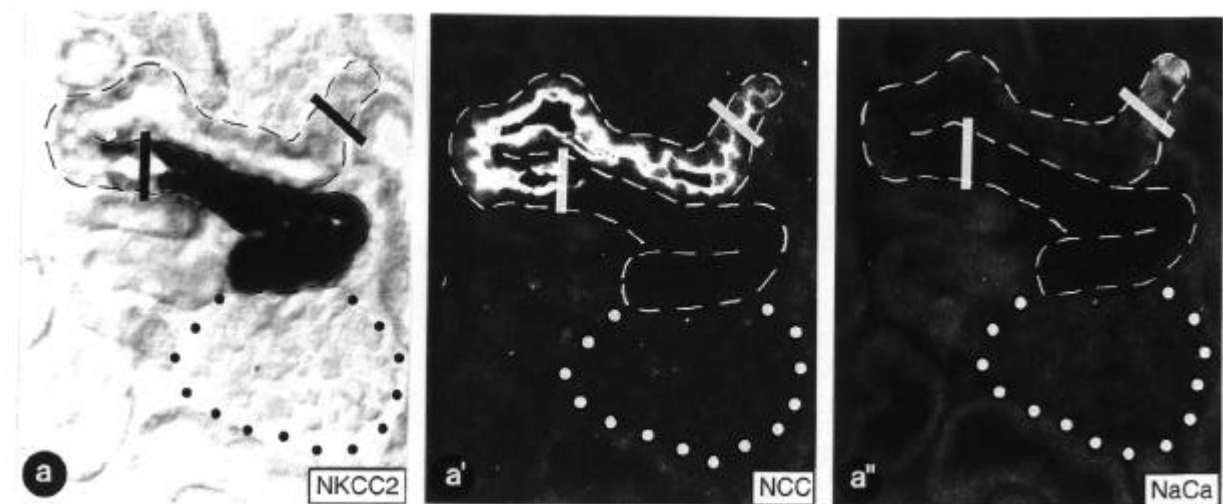


Abb. 10: Die typische Unterteilung des DCT, wie sie für den adulten Tubulus beschrieben ist, ist mittels dreifach-Markierung von NKCC2-mRNA, NCC- und NaCa-Protein in einem juxtamedullären Nephron der Rattenniere vom 1. Tag post partum dargestellt. Das NKCC2-positive post-Macula Segment (a) ist gefolgt vom NCC-positiven DCT1 (a'). Der Beginn des DCT2 zeichnet sich durch die Koexpression von NCC und NaCa aus (a''). Vergrößerung: x 520.

4.3 Expression von 11HSD

Im adulten Rattenephron ist 11HSD im Epithel des DCT2 und des CNT lokalisiert. Außerdem im Epithel des Sammelrohres (CD = collecting duct), in dem die Expressionsintensität vom CCD stromabwärts in Richtung innerer Medulla abnimmt [Bostanjoglo et al. 1998].

Es wurde die 11HSD-Expression während der Nephrogenese auf mRNA- und auf Proteinebene untersucht. Auf beiden Ebenen wurde das früheste Auftreten von 11HSD im CNT von Nephronen im fortgeschrittenen Stadium III gefunden. Hinsichtlich dieser frühen Expression fiel die starke Signalintensität sowohl bei In situ-Hybridisierung als auch bei Antikörpernachweis auf. Dabei ging die mRNA-Expression von 11HSD im CNT dem Auftreten von NaCa-Immunreaktivität voraus, das sich erst im frühen Stadium IV detektieren ließ. Im Gegensatz zur Situation in der adulten Niere konnte damit für den CNT eine Entwicklungsperiode demonstriert werden, die durch das Vorliegen von 11HSD ohne Kolo-kalisation von NaCa gekennzeichnet war. Diese im Vergleich zu NaCa frühere Expression von 11HSD blieb in dem zuletzt auswachsenden CNT-Abschnitt, proximal der Einmündung in den CD, bzw. in den Arkaden noch lange Zeit während der Nephronreifung erhalten (Abb. 11 c-c'').

Im frühen Stadium IV konnte 11HSD-mRNA in Kolo-kalisation mit NCC-Immunreaktivität im DCT-Epithel nachgewiesen werden. Dabei fielen gewundene Tubulusabschnitte auf, die für 11HSD und NCC positiv, jedoch für NaCa negativ waren (Abb. 11 b-b''). Ein solches Expressionsmuster deutete auf eine in der Nephronreifung vorkommende Expression von 11HSD im proximalen DCT hin und kommt im adulten Nephron, in dem die Expression von 11HSD und NaCa gemeinsam am Startpunkt des DCT2 beginnt, nicht vor [Bostanjoglo et al. 1998].

In bezug auf den CD war am 1., 3. und 4. Tag post partum eine schwache Expression im kortikalen und eine starke 11HSD-Expression im medullären Anteil festzustellen (Abb. 11 a). Die Expressionsintensität im CD nahm stromabwärts in kortikomedullärer Richtung zu. Es bot sich damit ein Bild, welches genau entgegengesetzt zum adulten Expressionsgradienten (s.o.) war. Am postnatalen Tag 8 hatte die Expressionsstärke im MCD ab- und im CCD

zugenommen (Abb. 11 a') und hatte sich damit der adulten Form stärker angeglichen. Die Ampulle war zu allen untersuchten Zeitpunkten frei von 11HSD.

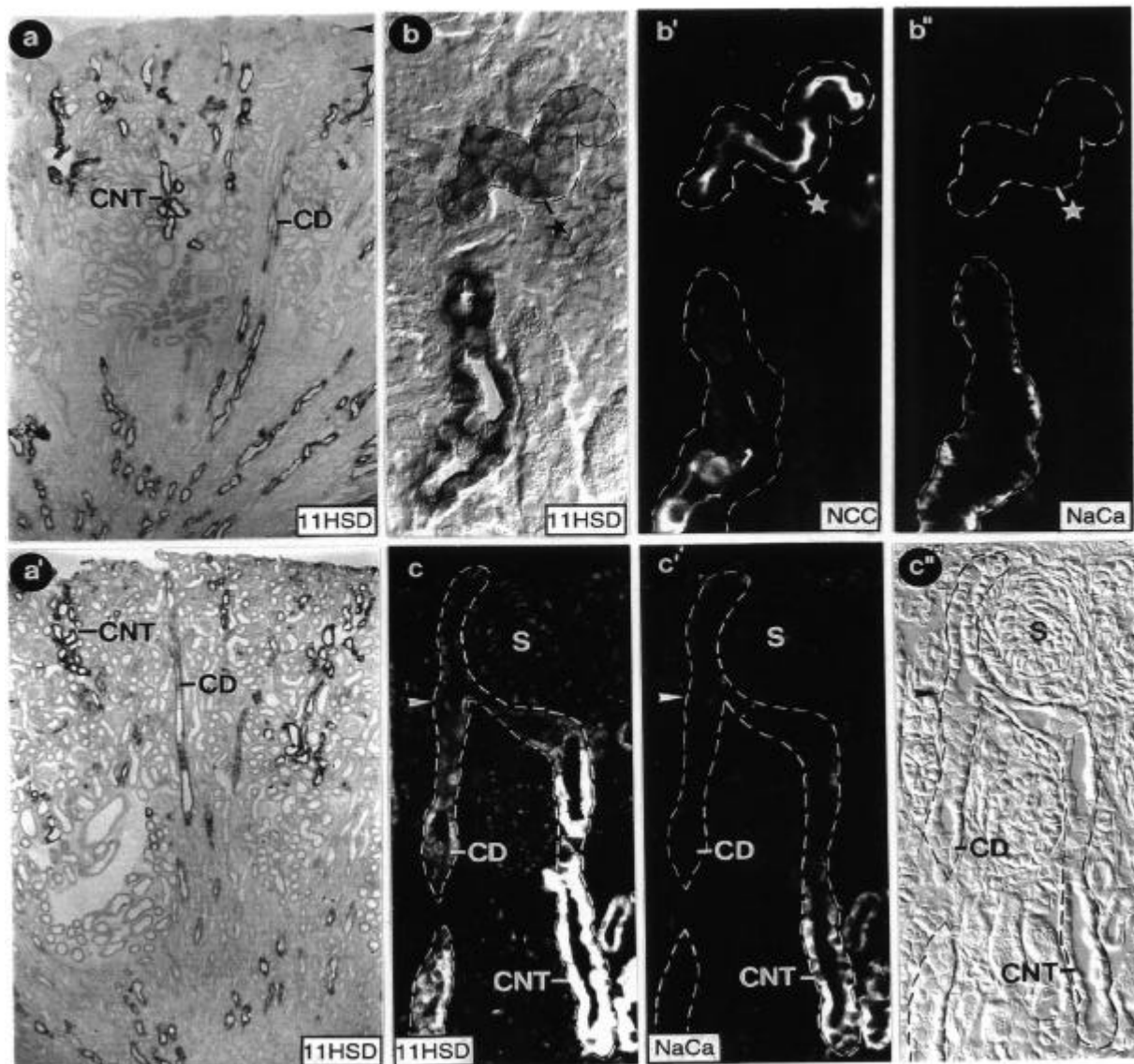


Abb. 11: Übersichtsaufnahme einer In situ-Hybridisierung für 11HSD am 3. Tag (a) und am 8. Tag (a'). Die Expression in CNT-Segmenten ist zu beiden Zeitpunkten gleich stark. Im medullären Teil des CD hingegen ist die Expressionsintensität am 3. Tag hoch, während es am 8. Tag schwächer, dafür aber im kortikalen CD stärker geworden ist. In der Region direkt unterhalb der nephrogenen Zone (durch Pfeilspitzen markiert) kann 11HSD in unreifen Tubulussegmenten nachgewiesen werden. Diese exprimieren teilweise gleichzeitig NCC aber kein NaCa, wie in b-b'' durch Dreifachmarkierung dargestellt. Die distale Einmündung des CNT in den CD ist in c-c' als Doppelmarkierung mit Antikörper gegen 11HSD und NaCa gezeigt (c'' zeigt die korrespondierende Aufnahme zu c und c' im Interferenzkontrast). Das 11HSD-Signal erstreckt sich weiter in den unreifen CNT als das Immosignal für NaCa und endet erst wenige Zellen vor der Einmündung in den CD. Im außerkortikalen CD ist die Immunreaktivität für 11HSD schwach und endet am Übergang in die Ampulle (Pfeilspitze). S markiert ein S-förmiges Körperchen. Vergrößerungen: x 110 (a, a'), x 520 (b-b''), x 400 (c-c'').

4.4 Expression von rENaC

Im adulten Nephron ist die Expression von rENaC in Zellen des DCT, des CNT, des CCD und des äußeren MCD beschrieben worden [Duc et al. 1994].

Zur Detektion von rENaC während der Entwicklung wurden in der vorliegenden Arbeit für die mRNA-Ebene autoradioaktiv markierte Ribosonden für die β - und die γ -Untereinheit eingesetzt. Darüberhinaus wurden zum Nachweis des Proteins Antikörper gegen die α -, β - und γ -Untereinheit verwendet.

Im unreifen CNT des sich entwickelnden Nephrons wurde rENaC sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in einem frühen Entwicklungsstadium gefunden. Die zugehörigen Nephrone befanden sich in Stadium III und waren in kurzer Distanz zur renalen Kapsel lokalisiert (Abb. 12 b, c). Auffallend war dabei die fast exakte Kolokalisation von rENaC und 11HSD im gesamten CNT. Die einzige Ausnahme stellten wenige Zellen proximal des Übergangs in die Ampulle dar. In diesen Zellen wurde rENaC exklusiv, also ohne Kolokalisation von 11HSD, nachgewiesen (Abb. 12 a, a'). Dabei zeigten die rENaC und 11HSD exprimierenden Zellen am distalen Ende des CNT eine noch wenig differenzierte Zellmorphologie mit großer Kern:Plasma-Relation und wenig Organellen (Abb. 12 a'). rENaC wurde im CNT zunächst ohne Kolokalisation von NaCa detektiert. Daraus ergab sich analog zu den Ergebnissen der 11HSD-Expression (s. 5.3), daß auch die Expression von rENaC im CNT früher einsetzte als die von NaCa. In späteren nephrogenen Stadien dagegen fiel der proximale Startpunkt der Immunreaktivität für rENaC unmittelbar mit dem für NaCa zusammen (Abb. 13 a, a'). Der gemeinsame Startpunkt lag im distalen Konvolut und blieb während der Ausreifung des Nephrons bestehen. Die Intensität der Immunreaktivität für rENaC war proximal über einige Tubuluszellen sehr niedrig und nahm nach distal zu (Abb. 13 a). Selten wurde allerdings auch beobachtet, daß der Startpunkt der tubulären rENaC-Immunreaktivität etwas weiter distal lokalisiert war als für die NaCa-Immunreaktivität. Hierbei könnte es sich tatsächlich um eine Heterogenität in der proximalen Ausdehnung von rENaC innerhalb unterschiedlicher Nephrone gehandelt haben, oder aber es lag schlicht ein Sensitivitätsproblem zugrunde, was in Anbetracht der proximal wenig intensiven Immunreaktivität für rENaC am wahrscheinlichsten ist.

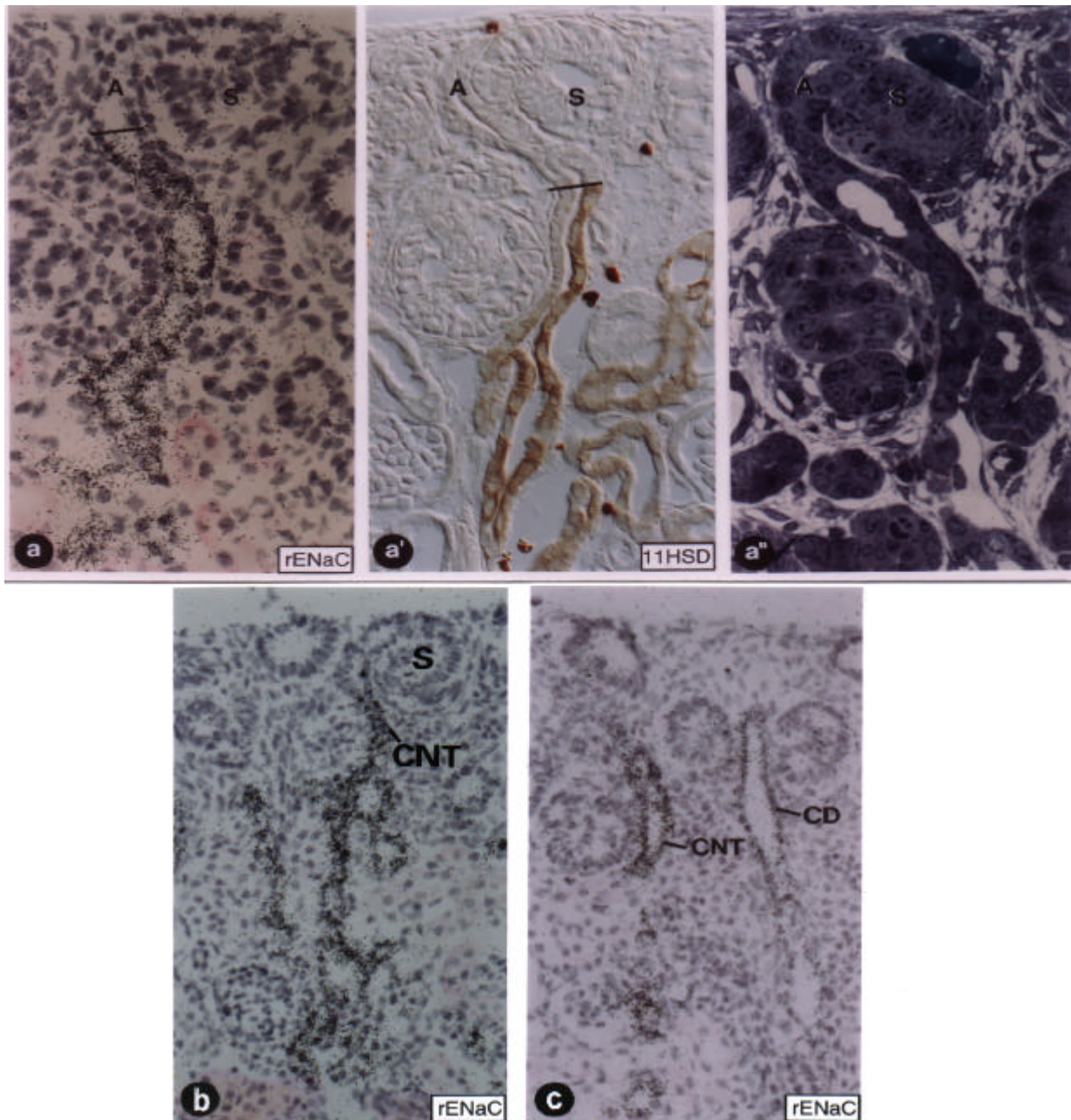


Abb. 12: : Die Expression von β -rENaC im distalen CNT Segment am 4. Tag post partum, nachgewiesen durch autoradiographische In situ-Hybridisierung, die mit Hämatoxylin-Eosin gegengefärbt wurde (a). In analoger Lokalisation zeigt a' die Immunreaktivität für 11HSD (Nachweis mit der PAP-Methode). In a'' ist die entsprechende Morphologie als Semidünnschnitt dargestellt, wobei auffällt, daß die Kern:Plasma-Relation noch hoch ist, und daß die Zellen noch keine basale Zellspezialisierung aufweisen. Die Expression von rENaC reicht bis zum Übergang in die Ampulle, A, die Expression von 11HSD endet wenige Zellen proximal dieses Punktes. Die schwarzen Balken markieren den Übergang vom CNT in die Ampulle; die subkapsulären S-förmigen Körperchen sind durch S markiert. In b und c sind subkapsuläre Ausschnitte der Expression von γ -rENaC als autoradioaktiv markierte In situ-Hybridisierung dargestellt. Das Expressionsmuster stimmt mit der Expression der β -Untereinheit überein (vgl. a und b). Die frühe Expression von rENaC im CNT ist auffallend stark, während sie im subkapsulären Anteil des CD zunächst relativ schwach ist. Vergrößerungen: x 520 (a-a''), x 400 (c-e).

Während der Tubulusreifung ließ sich durch Applikation von Antikörpern gegen rENaC und NCC auf Konsekutivschnitten eine signifikante Kolokalisation der beiden Transportproteine im DCT-Epithel demonstrieren (Abb. 13 a, a'). Die Kolokalisation erstreckte sich nach distal bis in gestreckte Tubulusabschnitte mit CNT-Charakter. Mit Ausreifung des DCT nahm die Koexpression in ihrer Ausdehnung ab, bis sie schließlich im differenzierten Nephron der 8 Tage alten Niere auf den DCT2 beschränkt war (Abb. 13 b,b'). In DCT2 und CNT aller untersuchten Stadien fielen einzelne Zellen auf, die unreaktiv gegenüber rENaC- und NaCa-Antikörpern waren (Abb. 13 c, c'). Die fehlende Expression von rENaC bzw. von NaCa legte die Identität dieser Zellen als Schaltzellen nahe. Diese Vermutung wurde durch Doppelmarkierungen mit einem Antikörper gegen Bande 3, der Zwischenzellen des Typ A markiert [Alper et al. 1989, Madsen et al. 1992], bestätigt.

Im Gegensatz zur Situation in der adulten Niere konnte rENaC auf mRNA- und Proteinebene entlang des gesamten Sammelrohres, mit Ausnahme der Ampulle, die in der in Regel frei von Signal war (Abb. 12 a, b) nachgewiesen werden. Dabei fiel in den 1, 3 und 4 Tage alten Nieren eine Zunahme an Signalintensität von der Ampulle abwärts in Richtung Medulla auf. Im CD der inneren Medulla war das Signal am stärksten ausgeprägt (Abb. 13 d, e). Am 8. Tag post partum war die Signalintensität in dieser Region leicht abgeschwächt, aber immer noch klar detektierbar (Abb. 13 f). Im kortikalen CD hatte die Expression von rENaC zugenommen.

Bei den durchgeführten Experimenten gab es keine Anzeichen für eine unterschiedliche Expression oder Variation in der Zusammenstellung der untersuchten rENaC-Untereinheiten, stattdessen waren die Untereinheiten stets kolokalisiert.

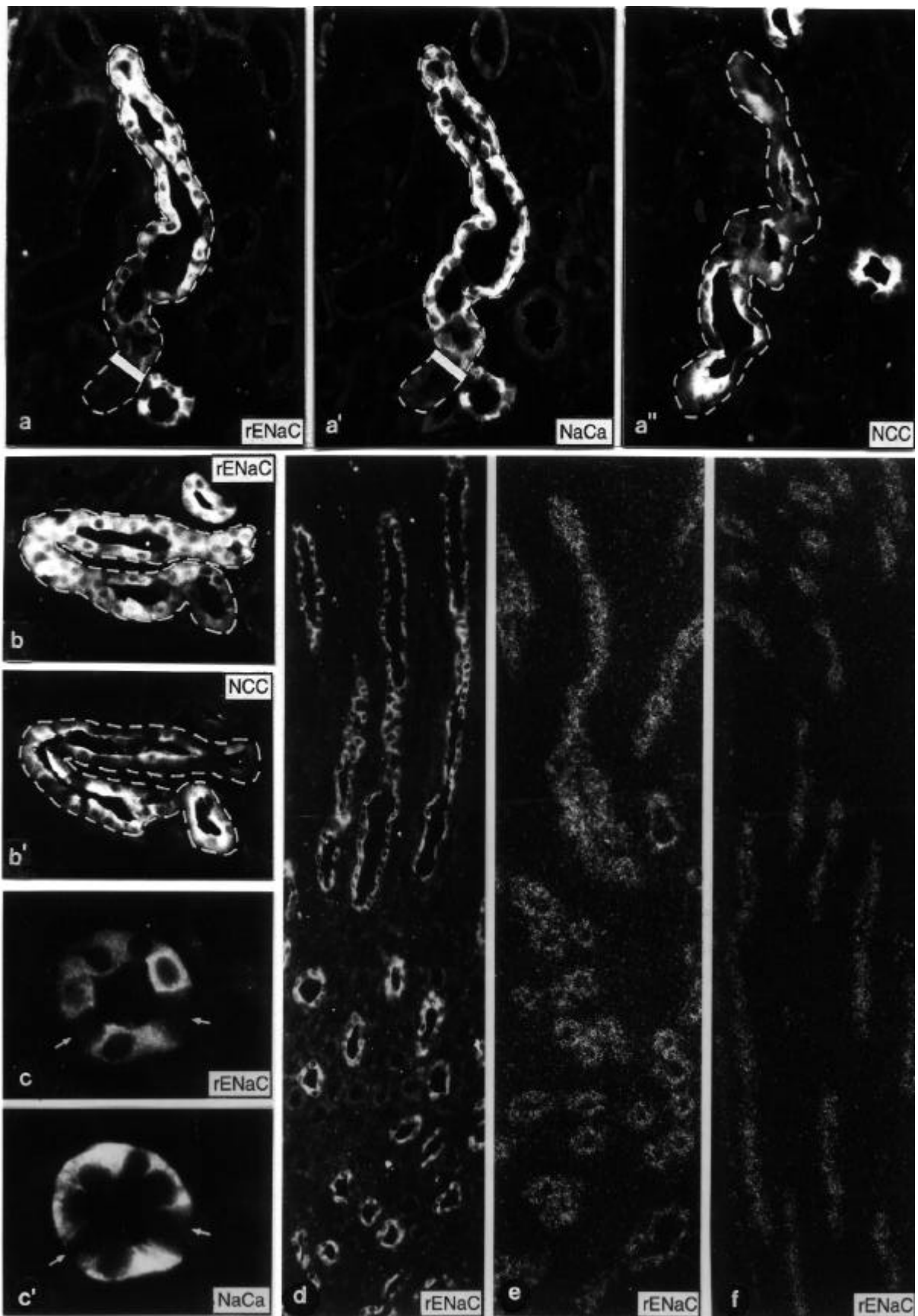


Abb. 13: Als Detailvergrößerung von der 3 Tage alten Niere zeigt die Doppelmarkierung a und a', daß der Startpunkt einer schwachen β -rENaC Immunreaktivität mit dem Startpunkt der Immunreaktivität für NaCa im subkapsulären DCT zusammentrifft (die Balken markieren den Übergang in den immunreaktiven Abschnitt). Nach distal nimmt die Immunreaktivität für rENaC an Intensität zu. In a'' ist auf einem Konsekutivschnitt gezeigt, daß das Epithel des proximaler gelegenen DCT-Abschnittes exklusiv immunreaktiv für NCC-Antikörper ist. Im sich anschließenden Tubulussegment überlappen sich die drei Signale. Ein ähnlicher Übergangsbereich ist in b und b' als Ausschnitt der 8 Tage alten Niere dargestellt. Die proximal zunächst schwache Reaktivität von β -rENaC ist über einige Zellen kolokalisiert mit dem NCC-Signal. Nach distal nimmt das Signal für β -rENaC an Intensität zu, während das Signal für NCC schwächer wird. Als typischer Befund wurden bei Antikörperrnachweisen in allen Stadien Tubulusanschnitte beobachtet, die neben ihrer positiven Immunreaktivität für rENaC und NaCa zwischenliegende unreaktive Schaltzellen aufwiesen (in c und c' mit Pfeilen markiert). Am 4. Tag zeigte der MCD eine starke Expression von rENaC, wie in d mittels Antikörper und in e mittels autoradiographischer In situ Hybridisierung für β -rENaC demonstriert. Die etwas schwächere rENaC-Expression im MCD, wie sie am 8. Tag zu finden war, ist anhand einer In situ-Hybridisierung für γ -rENaC in f dargestellt. Vergrößerungen: x 420 (a-a'', b, b'), x 1000 (c, c'), x 400 (d-f).

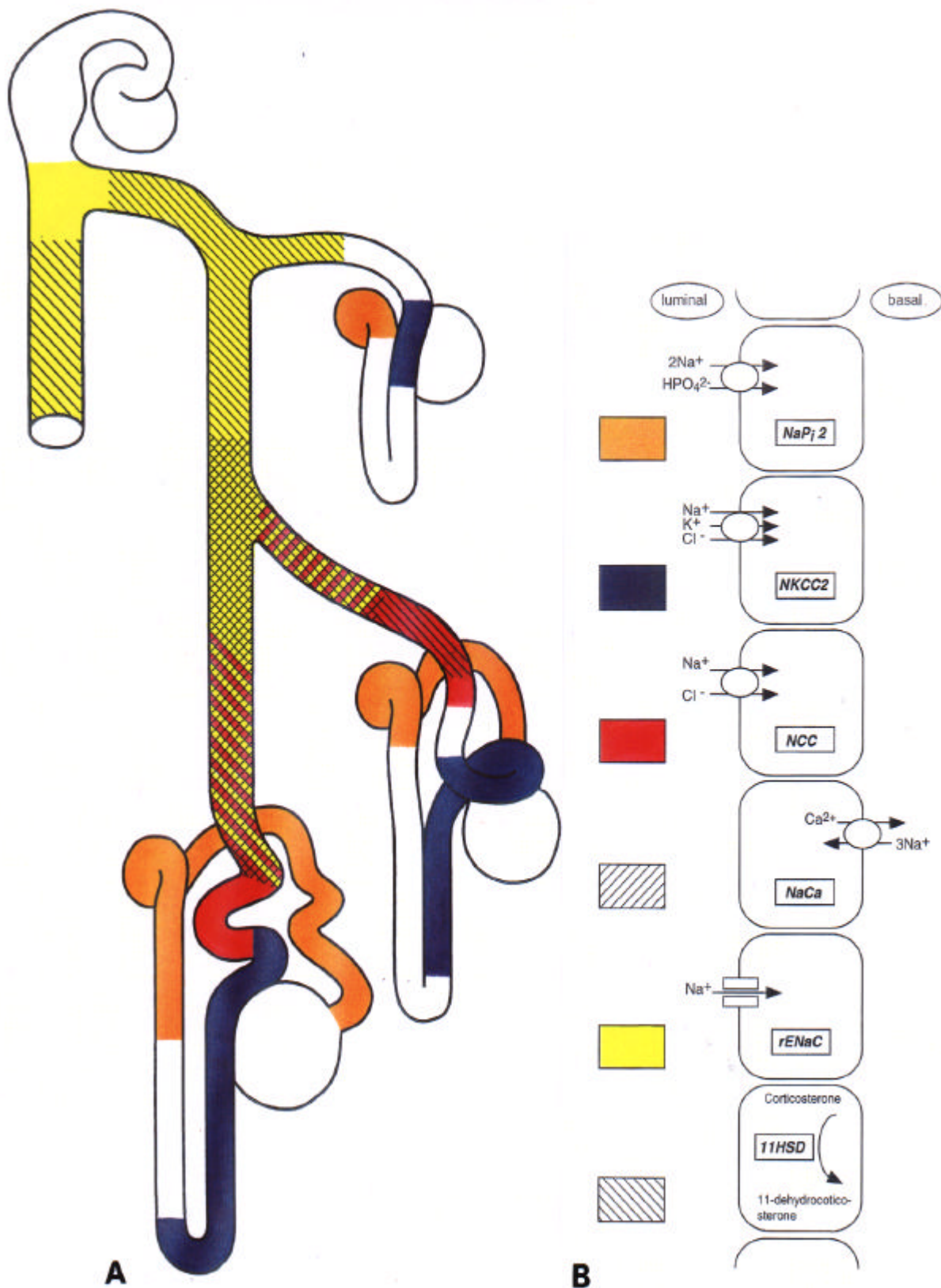


Abb. 14: Die schematische Darstellung aus Abb. 2 ist hier wieder aufgegriffen, um die Verteilung der untersuchten Proteine während der Ontogenese synoptisch zu verdeutlichen (A). B gibt die physiologische Funktion der Proteine wieder und erklärt ihre jeweilige Kodierung in Schema a durch Farben und Linien.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden detaillierte, ontogenetische Expressionsmuster für die untersuchten Na^+ -transportassoziierten Proteine erarbeitet. Im folgenden sollen die Ergebnisse gegliedert nach den morphologischen Abschnitten des distalen Tubulus erläutert und diskutiert werden.

5.1 Henle'sche Schleife und Macula densa (MD)

In der primitiven Henle'schen Schleife wurde schon in Nephronen des Stadiums III eine starke Expression von NKCC2 gefunden. Damit beginnt die Expression dieses Transporters entscheidend vor Beginn der glomerulären Filtration. Das Signal war zunächst auf die Region der zukünftigen MD konzentriert und dehnte sich später in Richtung der Haarnadelbiegung der Henle'schen Schleife aus. Neben der frühen ontogenetischen Expression von NKCC2 zeigten die MD Zellen eine frühe ultrastrukturelle Spezialisierung, wie sie auch für MD-Zellen in der humanen Niere beschrieben wurde [Dörup et al. 1982]. Die frühe funktionelle sowie morphologische Differenzierung der MD wirft die Möglichkeit einer besonderen Bedeutung dieser Struktur während der Nephrogenese auf. Die MD bildet einen Bestandteil des juxtaglomerulären Apparates, der am Gefäßpol des Glomerulums lokalisiert ist und im Dienste renaler und systemisch relevanter Regulationsvorgänge steht. Nach der aktuellen Modellvorstellung sollen die MD-Zellen als Sensor für die tubuläre NaCl-Konzentration dienen, indem sie bei einem Anstieg der tubulären Strömungsrate bzw. der tubulären NaCl-Konzentration mehr NaCl reabsorbieren. Die so registrierte NaCl-Konzentration soll zwei unterschiedliche Mechanismen steuern, in die die NO-Synthase und die Cyclooxygenase-2 als Modulatoren involviert zu sein scheinen. Zum einen soll ein Anstieg der tubulären NaCl-Konzentration zur Abnahme der Filtrationsrate im korrespondierenden Glomerulum führen. Dieser Mechanismus, der vor allem der kurzzeitigen Anpassung der glomerulären Filtrationsrate dient, wird als sogenannter tubuloglomerulärer Feedback bezeichnet [Überblick in Bachmann 1997, und Schnermann 1998]. Ein zweiter eher langfristig wirkender Mechanismus soll die Reninsekretion der afferenten Arteriole so regulieren, daß über das Renin-Angiotensin-System die extrazelluläre Na^+ -Konzentration stabilisiert wird [Überblick

in Bachmann 1997, und Schnermann 1998]. Der Kotransporter NKCC2, für den eine hohe Expression in der adulten MD nachgewiesen ist [Obermüller et al. 1996], soll für die dem Tubulusstrom proportionale Reabsorption von NaCl verantwortlich sein und somit das biochemische Korrelat für das luminale NaCl-Sensorsystem darstellen [Lapointe et al. 1990, Schnermann 1998]. Als physiologischer Hintergrund für die frühe NKCC2-Expression in der MD, die in ähnlicher Weise auch in der Mäuseniere beobachtet wurde [Igarashi et al. 1995], wäre eine entwicklungsabhängige Rolle in den angesprochenen Regulationsmechanismen denkbar. Die möglichst frühe Initiation eines effektiven tubuloglomerulären Feedbacks, und damit die Möglichkeit die glomeruläre Filtration zu kontrollieren, könnte eine wichtige Bedeutung für den unreifen Organismus haben. Schließlich darf die Filtrationsrate die Reabsorptionskapazität des noch unreifen Tubulus angesichts der postnatal hohen Anfälligkeit für eine Volumen- und Elektrolytdepletion nicht überschreiten. Tatsächlich ist die glomeruläre Filtrationsrate der Rattenniere postnatal zunächst sehr niedrig und steigt erst über einen langen Zeitraum kontinuierlich an, bis sie nach ca. 8 Wochen adulte Werte erreicht hat [Aperia et al. 1992]. Daß die niedrige Filtrationsrate nicht einfach anatomisch durch die Unreife des Glomerulums bedingt sondern funktionell eingestellt ist, wurde durch Versuche an Kaninchen deutlich, die eine postnatale Volumenexpansion mit einer erhöhten glomerulären Filtrationsrate beantworteten [Goldsmith et al. 1979]. Die jungen Nephronen waren also bereits in der Lage auf eine Veränderung des inneren Milieus adäquat zu reagieren, was einen funktionierenden tubuloglomerulären Feedback wahrscheinlich macht. Darüberhinaus konnte in Mikropunktionsstudien gezeigt werden, daß die Reabsorptionskapazität im PT und auch im TAL postnatal niedrig ist [Horster 1978 und 1982, Aperia et al. 1992]. Da in diesen Tubulusabschnitten wenig reabsorbiert wird, ist am MD-Segment mit einer erhöhten Salzladung zu rechnen. Dies könnte in Anbetracht der nachgewiesenen hohen Expression von NKCC2 mit einer erhöhten Salzreabsorption in der MD einhergehen und somit entsprechend dem oben diskutierten Feedbackmechanismus zu einer Abnahme der Filtrationsrate führen. Darüberhinaus könnte auch ein Bezug zu dem vermuteten zweiten, eher langfristig wirkenden Regulationsmechanismus hinsichtlich einer Stabilisierung der extrazellulären Na^+ -Konzentration über das Renin-Angiotensin-System von Bedeutung sein. Passend zu den angestellten Überlegungen konnte eine frühe Expression der in diese Mechanismen involvierten Enzyme NO-Synthase und Cyclooxygenase-2 in der MD sowie von Renin in der afferenten Arteriole gezeigt werden [Fischer et al. 1995, Zhang et al. 1997].

Die hohe Expressionsrate für NKCC2 in der MD und vor allem die Tatsache, daß NKCC2 schon vor Beginn der glomerulären Filtration detektiert werden konnte, könnte aber auch auf eine weitere, spezifisch entwicklungsphysiologische Funktion dieses Proteins bzw. der MD an sich hinweisen. In diesem Zusammenhang ist die neonatale Form des Bartter-Syndroms interessant, bei dem die homozygote Mutation für das NKCC2-kodierende Gen vorliegt. Dabei kommt es neben Volumen- und Elektrolytstörungen (s. 2.1) zu mikroanatomischen Abweichungen, wobei vor allem eine retardierte glomeruläre Entwicklung sowie eine Hypertrophie des juxtaglomerulären Apparates auffallen [Barajas et al. 1994, Taugner et al. 1988, Wong et al. 1996]. Diese Beobachtungen lassen sich möglicherweise dadurch erklären, daß der regulatorische Einfluß, den die MD-Zellen normalerweise auf die strukturelle Entwicklung des Glomerulums und des juxtaglomerulären Apparates haben könnten, von NKCC2 abhängt. Nach dieser Hypothese könnte eine Fehlexpression dieses Proteins, wie sie im Bartter-Syndrom auftritt, direkt zu den angesprochenen Entwicklungsstörungen führen. Möglicherweise spielt NKCC2 also während der Entwicklung eine besondere Rolle hinsichtlich der mikromorphologischen Differenzierung renaler Strukturen, die über seine prospektive Funktion als apikal-reabsorptivem Ionentransporter und NaCl-Sensor des juxtaglomerulären Apparates hinausgeht.

Zur vergleichenden Analyse des distalen und proximalen Anteils der Henle'schen Schleife wurde die Expression von NaPi2 untersucht. Die mRNA-Expression dieses Proteins zeigte ihr initiales Auftreten im unreifen proximalen Konvolut. Der PST hingegen war noch während einer längeren Entwicklungsphase frei von NaPi2-mRNA und begann erst spät mit der Expression. Im Vergleich war die Expression von NKCC2 im distalen Schenkel der Henle'schen Schleife bereits wesentlich früher zu detektieren. Die mikromorphologische Reifung der Henle'schen Schleife ist von Neiss sehr detailliert beschrieben worden [Neiss 1982a]. Demnach beginnt die entscheidende Verlängerung des zunächst sehr kurzen PST erst, wenn sich in der Henle'schen Schleife bereits ein tubuläres Lumen gebildet hat. Dabei wächst die unreife Schleife in distaler Richtung aus, wobei das undifferenzierte niedrige Epithel des absteigenden Schenkels durch büstensaumtragendes proximales Tubulusepithel ersetzt wird. Betrachtet man die NaPi2-Expression als repräsentativen Indikator für eine funktionelle Ausdifferenzierung des proximalen Tubulusepithels, so konnte in der vorliegenden Arbeit entsprechend den mikromorphologischen Beobachtungen von Neiss gezeigt werden, daß sich auch die funktionelle Differenzierung des PST relativ spät während der Nephrogenese

vollzieht. Die Expression von NaPi2 im PST begann sich langsam in distaler Richtung auszubreiten, als sich bereits ein tubuläres Lumen gebildet hatte. Gleichzeitig entwickelte sich distal des auswachsenden PST der dünne Teil des absteigenden Schenkels der Henle'schen Schleife (DTL = descending thin limb) aus dem niedrigen, unreifen Epithel des absteigenden Schenkels. In der adulten Niere ist das Epithel des DTL wenig differenziert und zeichnet sich durch eine geringe Cytoplasmamenge und eine Armut an Zellorganellen aus [Übersicht in Bachmann 1998]. Durch eine hohe Permeabilität für Wasser und NaCl und die anatomische Nähe zum TAL hat der reife DTL herausragende Bedeutung für das renale Gegenstromsystem, auf das der Mechanismus der Harnkonzentrierung aufbaut [Berliner 1976, Übersicht in Hierhofer et al. 1995]. Die demonstrierte relativ späte Entwicklung des DTL mag dazu beitragen, daß die Harnkonzentrierungskapazität bei Ratten erst im Alter von 6–8 Wochen und bei Menschen im Alter von 1,5 Jahren adulte Werte erreicht [Poláček 1965, Rane 1985].

In langen Henle'schen Schleifen, d.h. in Schleifen die bis in die innere Medulla reichen (s. Abb. 1), existiert ein dünner Teil im aufsteigenden Schenkel der Henle'schen Schleife (ATL = ascending thin limb). Der Übergang dieses ATL in den TAL markiert definitionsgemäß die Grenze zwischen innerer und äußerer Medulla. Im ATL finden im Gegensatz zum energieaufwendigen Elektrolyttransport des TAL hauptsächlich passive Transportprozesse statt, das Epithel ist sehr niedrig, arm an Zellorganellen und exprimiert kein NKCC2 [Übersicht in Bachmann 1998, Obermüller et al. 1996]. Hinsichtlich des ATL-Epithels beschreibt Neiss eine im Vergleich zum DTL-Epithel unterschiedliche Genese [Neiss 1982a]. Während sich der DTL wie bereits erwähnt direkt aus dem niedrigen Epithel des unreifen absteigenden Schenkels bildet, entwickelt sich im gesamten aufsteigenden Schenkel der Schleife zunächst hohes distaltubuläres TAL-Epithel. Die spätere Konversion vom hohen TAL-Epithel in das niedrige Epithel des ATL vollzieht sich nach Neiss, der in diesem Tubulussegment Autophagosomen und hohe lysosomale Aktivität nachweisen konnte, durch autolytische Prozesse. In Einklang mit diesen morphologischen Befunden wurde in der vorliegenden Arbeit in Nephronen des Stadiums IV NKCC2-mRNA noch im gesamten aufsteigenden Schenkel der Henle'schen Schleife demonstriert, was den TAL-Charakter dieses Segmentes unterstreicht. Dabei exprimierten am 1. Tag post partum auch die aufsteigenden Schenkel und Schleifenbiegungen jener Henle'schen Schleifen, die bis in die innere Medulla reichten, noch durchweg NKCC2. Die Differenzierung des NKCC2-negativen

ATL begann erst nach dem 1. Tag. Diese Beobachtung korrespondiert mit den Befunden von Neiss, der den Beginn der Umformung von TAL- in ATL-Zellen um den ersten Tag postnatal datiert [Neiss 1982a]. Die Differenzierung des ATL aus TAL-Zellen stellt eine Konversion von funktionell zumindest teilweise schon differenziertem Epithel in eine andere Epithelform dar. Es ist denkbar, daß dieser Prozeß als Antwort auf die entwicklungsabhängige Reifung der tubulären Transportkapazität und der zunehmenden Tubuluslänge verstanden werden kann. So könnte die weite Ausdehnung der NKCC2-Expression, die zunächst den gesamten aufsteigenden Schenkel und die Schleifenbiegung in allen Henle'schen Schleifen miteinbezieht, einen notwendigen Kompensationsmechanismus für die unreife, weniger effektive Reabsorptionsfähigkeit anderer Tubulussegmente darstellen. Mit zunehmender Zellspezialisierung und der Ausreifung einer effektiven Reabsorptionskapazität wäre dann eine relative Verkürzung des NKCC2-exprimierenden Segmentes möglich und ein Teil der energieaufwendigen TAL-Zellen könnte durch energiesparende ATL-Zellen ersetzt werden. Dabei bestimmt anscheinend die histotopographische Lokalisation, d.h. ob sich die Tubuluszellen innerhalb oder außerhalb des inneren Markes befinden, über das Beibehalten der TAL-Charakteristika oder die Umformung zu ATL-Zellen.

Da das Auftreten von NKCC2 und NaPi2 in dieser Arbeit nur auf mRNA-Ebene untersucht wurde, ist es bei allen angestellten Überlegungen natürlich auch nicht auszuschließen, daß die kodierenden Gene zwar früh transkribiert werden, daß dies aber nicht mit der Synthese funktionellen Proteins einhergeht. In weiterführenden Versuchen müßte zur Absicherung der Ergebnisse daher ein analoger Nachweis mittels Antikörpermarkierung auf Proteinebene folgen.

5.2 Distales Konvolut (DCT)

Der adulte DCT, der kurz hinter der MD beginnt, exprimiert über seine gesamte Länge NCC [Obermüller et al. 1995, Bachmann et al. 1995]. Die ontogenetische Expression von NCC wurde zuerst im distalen Teil des DCT beobachtet. Später dehnte sie sich nach proximal aus, bis sie schließlich den Schnittpunkt mit dem post-Macula Segment des TAL erreichte. In

bezug auf die Relation zwischen mRNA und translatiertem Protein konnte dabei nachgewiesen werden, daß schon die früheste Expression von mRNA für NCC mit der Bildung des immunreaktiven Proteins einherging. Dabei war die Immunreaktivität, wie für den adulten Tubulus beschrieben [Bostanjoglo et al. 1998, Plotkin et al. 1996], schon beim ersten Auftreten des Transporters am apikalen Zellpol der DCT-Zellen konzentriert. Offenbar wird das Protein von Anfang an gezielt in die lumenseitige Plasmamembran eingebaut. Im Gegensatz dazu wurde für andere Transporter, wie z.B. die Na^+/K -ATPase, beschrieben, daß der Einbau in die Membran der Tubuluszelle zu Beginn der Expression im Unterschied zur reifen Zelle nicht vollständig polarisiert ist [Minuth et al. 1987]. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß die Expression von NCC erst in einem vergleichsweise späten Stadium beginnt. Insofern könnte der von Anfang an polarisierte Membraneinbau von NCC durch ein zu diesem Zeitpunkt schon suffizient ausgereiftes System zellulärer Polarisierungsmechanismen erklärt werden. Viele Aspekte der einzelnen Vorgänge, die zur epithelialen Polarisierung beitragen, sind noch weitgehend unklar, jedoch konnten verschiedene Komponenten der beteiligten Systeme charakterisiert werden [Ekblom 1989; Nelson 1992, Brown et Stow 1996]. Inwieweit diese in den polarisierten Membraneinbau der renalen Na^+ -Transporter involviert sind, ist gegenwärtig weitgehend unbekannt. Im Hinblick auf mögliche Störungen bei der epithelialen Polarisierung und den zellulären Fehleinbau von Elektrolyttransportern, wie z.B. bezüglich des Pathomechanismus der polyzystischen Nierenerkrankung diskutiert [Übersicht in Wilson 1997], wäre eine genauere Untersuchung dieser Korrelation während der Ontogenese interessant.

Wenn sich die Expression von NCC in proximaler Richtung bis zum post-Macula Segment ausgedehnt hat, schließt sich eine Entwicklungsphase an, in der ein kurzes Tubulussegment existiert, in dem sich NCC und NKCC2 überlappen. Zu dieser Überlappung, die im adulten Nephron nicht vorkommt [Obermüller et al. 1995], kam es im morphologisch schon relativ reifen Stadium IV, was darauf hindeutet, daß die endgültige Determination der Zellfunktion in der Übergangszone zwischen TAL und DCT erst spät während der Ontogenese stattfindet.

Ähnlich spät kam es in bezug auf die distale Grenze des DCT, also den Übergang in den CNT, zur endgültigen Determination. Der Übergang zwischen dem DCT und dem CNT war zunächst von Vorgängen proportionaler Verschiebung gekennzeichnet. Auffällig war vor allem der Übergangsbereich, in dem verschiedene Generationen von Tubuli zu Arkaden

fusionierten. In der Rattenniere nimmt jedes Sammelrohr jeweils 5–6 Nephrone auf. Davon werden nur die beiden am weitesten subkapsulär gelegenen, also zuletzt induzierten, Nephrone über einen individuellen CNT drainiert. Die CNT der 3–4 juxtamedullär und mediokortikal gelegenen Nephrone hingegen erreichen das Sammelrohr über eine gemeinsame Arkade [Neiss 1982b]. Im adulten Nephron beginnt das typische Epithel des CNT etwas proximal der Arkadenformation [Kaissling et al. 1979], so daß das Tubulussegment vor der Arkade den CNT-typischen Transporter NaCa exprimiert, gleichzeitig aber frei von NCC ist. In der sich entwickelnden Niere hingegen wurde NCC im Tubulussegment direkt proximal der Arkade stark exprimiert, während die Immunreaktivität für NaCa in diesem Segment schwach war. Erst im Laufe der späten Reifung nahm die Anzahl der Zellen ohne NCC-Expression, aber mit starkem NaCa-Signal, proximal des Übergangs in die Arkade zu, so daß das Segment ein CNT-typisches Aussehen erhielt. Morphologische Untersuchungen auf ultrastruktureller Ebene haben ebenfalls gezeigt, daß sich während der Nephronreifung lange Zeit keine klare Grenze zwischen dem Ende des DCT und dem Beginn des CNT ziehen läßt [Dörup et al. 1982, Neiss 1982b]. Eine gewisse Flexibilität hinsichtlich der Proportion des DCT scheint in der adulten Niere beibehalten zu werden. Jedenfalls weisen darauf Experimente von Loffing et al. an Ratten hin, in denen eine durch chronische Furosemidinfusion erhöhte Salzladung im DCT zu einer Hyperplasie der DCT-Zellen führte [Loffing et al. 1995]. Ein weiterer ähnlich aufgebauter Versuchsansatz derselben Arbeitsgruppe ist an dieser Stelle unter einem anderen Aspekt interessant. Wurde statt Furosemid ein Thiaziddiuretikum in hoher Konzentration verabreicht, stellten sich bei den untersuchten Ratten peritubuläre Entzündung und Apoptose von DCT-Zellen ein [Loffing et al. 1996]. Dabei war erstaunlicherweise nur der DCT1 von diesen Schäden betroffen, während der DCT2 verschont blieb. Loffing et al. führten die Apoptose und die strukturellen Schäden der DCT-Zellen auf ein osmotisches Phänomen zurück. Dabei gingen sie davon aus, daß die Blockade von NCC durch Thiazidgabe zu einem Mangel an intrazellulärem Na^+ mit osmotischen Konsequenzen führt. Da die Schäden aber nur im DCT1 auftraten, schlußfolgerten Loffing et al., daß es im DCT2 neben dem Transportweg via NCC einen weiteren Na^+ -Transportweg geben müßte. Würde der Transportweg via NCC durch Thiazide unterbrochen, so könnte dieser zweite thiazidunabhängige Na^+ -Reabsorptionsweg den intrazellulären Na^+ -Bestand sichern und den DCT2 so vor dem vermuteten osmotischen Streß bewahren. Nach den Untersuchungen von Duc et al., die rENaC im DCT lokalisiert hatten [Duc et al. 1994], wurde rENaC als wahrscheinlicher Kandidat für diesen zweiten Na^+ -Transportweg vorgeschlagen [Loffing et al. 1996]. In ihrer Studie hatten Duc et al. die

Ausdehnung der rENaC-Expression im DCT, den sie nach rein morphologischen Kriterien als solchen bestimmt hatten, allerdings nicht spezifiziert und stattdessen pauschal über eine Expression von rENaC entlang des gesamten DCT berichtet. Wäre rENaC aber tatsächlich entlang des gesamten DCT exprimiert, so hätte der von Loffing et al. vermutete Mechanismus auch die Zellen des DCT1 vor Schäden durch Thiazidgabe bewahren müssen. In der vorliegenden Arbeit ist es durch Kolokalisationsnachweise mit NCC und NaCa gelungen den exakten Beginn der rENaC-Expression am Übergang vom DCT1 in den DCT2, während der Entwicklung und im weitgehend reifen Nephron, zu demonstrieren. Damit wird nicht nur das Ergebnis von Duc et al. konkretisiert, sondern außerdem die Hypothese von Loffing et al. in bezug auf den postulierten zweiten Na^+ -Transportweg via rENaC in DCT2-Zellen gestützt.

Im Hinblick auf die ontogenetisch schon frühe Expression von rENaC im DCT2 sind außerdem Ergebnisse älterer Mikropunktionsstudien interessant. Während der adulte DCT ungefähr 7% des glomerulär filtrierten NaCl reabsorbiert, geht aus Mikropunktionsen an neonatalen Ratten, Hunden und Meerschweinchen hervor, daß die Reabsorptionsfraktion des postnatalen DCT deutlich höher liegt [Kleinman 1975, Aperia et al. 1981, Merlet-Benichou et al. 1977]. Als mögliche Ursache für die größere Na^+ -Reabsorptionsleistung durch den DCT wurde ein Einfluß des postnatal erhöhten Spiegels an zirkulierendem Mineralokortikoid diskutiert [Henning 1978, Merlet-Benichou et al. 1977]. Ein hoher Mineralokortikoidspiegel könnte für die nachgewiesene, starke Expression von rENaC im DCT2 verantwortlich sein, und folglich über Na^+ -Transport via rENaC zu der erhöhten Na^+ -Reabsorptionsfraktion im DCT beitragen. In jüngeren Arbeiten wurde darüberhinaus auch für NCC eine beachtliche Induktion durch Mineralokortikoid demonstriert [Velázquez et al. 1996, Kim et al. 1998]. Obwohl die Expression von NCC in frühen Stadien zunächst nur im distalen DCT nachweisbar war, ließ sich in späteren Stadien eine hohe Expressionrate von NCC entlang des gesamten DCT demonstrieren, was ebenfalls zur postnatal erhöhten Reabsorptionsfraktion des DCT beitragen könnte. Allerdings sind im adulten DCT zwar ca. 50% der Na^+ -Reabsorption mineralokortikoidinduziert [Morel et al. 1981 und 1992], jedoch ist die postnatale Ansprechbarkeit der Rattenniere auf Mineralokortikoide relativ gering (s. 6.4) [Stephenson et al. 1984]. Unabhängig von der Mineralokortikoidwirkung könnte deshalb auch die Heterogenität in der funktionellen Reifung des Tubulussystems für den prozentual hohen Anteil der Na^+ -Reabsorption im DCT entscheidend sein. Aperia et al. verweisen in diesem Zusammenhang auf eine funktionelle Unreife des PT während sich der DCT schon früh in

einem funktionell effizienten Stadium befindet [Aperia et al. 1981].

5.3 Verbindungstubulus (CNT)

Es ist seit längerem bekannt, daß der CNT nicht nur als “Zubringer” von Tubulusharn an den CD verstanden werden darf, sondern daß dieses Segment darüber hinaus besondere funktionelle Bedeutung hat. So spielt der CNT als das am weitesten distal gelegene Segment, welches Ca^{++} unter dem Einfluß von Parathormon reabsorbiert, eine wichtige Rolle für die Ca^{++} -Homöostase [Morel et al. 1992, Chabardés et al. 1975]. Dies spiegelt sich in der spezifischen Expression des Proteins Calbindin- $\text{D}_{28\text{K}}$, das cytosolisches Ca^{++} bindet, und in der Expression des Transportproteins NaCa wider [Borke et al. 1989, Reilly et al. 1993]. In der Rattenniere produzieren die CNT-Zellen zudem selektiv Kallikrein [Barajas et al. 1986] und besitzen Bradikinin B2-Rezeptoren, was eine funktionelle Rolle des CNT im Kallikrein-Kinin-System nahelegt [Figuerola et al. 1995]. Entwicklungsgeschichtlich gibt der Ursprung des CNT immer wieder Anlaß zu Diskussionen. Dabei wird spekuliert, ob sich der CNT aus der einwachsenden Ureterknospe entwickelt, worin die Erklärung für die gemeinsamen Merkmale von CNT und CD zu finden sein könnte [Kaissling et al. 1995], oder ob er aus dem metanephrogenen Blastem hervorgeht, worauf histologische Beobachtungen während der Entwicklung hindeuten [Neiss 1982a]. In der vorliegenden Arbeit fiel eine sehr frühe Expression der mineralokortikoidassoziierten Proteine rENaC und 11HSD im morphologisch noch relativ unreifen CNT auf. Dabei ging das Auftreten dieser Proteine dem frühesten Erscheinen von NaCa, als CNT-spezifischem Marker, deutlich voraus. Generell könnte die frühe und starke Expression von rENaC und 11HSD in morphologisch undifferenzierten CNT-Zellen auf eine spezifische Rolle von mineralokortikoidinduzierten Effekten während der Zelldifferenzierung des CNT hindeuten. Dabei würde die enzymatische Wirkung von 11HSD bereits in recht unreifen Zellen eine Selektivität des ansonsten unspezifischen MR erlauben. In bezug auf den Ursprung des CNT ist die frühe Expression von 11HSD und rENaC ohne Koexpression von NaCa interessant, da dieses Expressionmuster normalerweise für den CD typisch ist [Bostanjoglo et al. 1998, Duc et al. 1994]. Die vorübergehende, selektive Expression von 11HSD und rENaC könnte dafür sprechen, daß der CNT vom Gewebe der Sammelrohranlage abstammt und er seine CNT-spezifischen Charakteristika erst

im Laufe der Reifung durch induktive Vorgänge im Wechselspiel mit dem distalen Nephron annimmt. Andererseits kann durch das spätere Auftreten von NaCa im CNT natürlich nicht ausgeschlossen werden, daß der CNT trotzdem vom nephrogenen Blastem abstammt. Die zeitweise exklusive Expression von 11HSD und rENaC in prospektiven CNT-Zellen könnte dabei einfach Ausdruck eines spezifischen Differenzierungsprogrammes sein, welches eine spätere Expression von NaCa determiniert. Außer der Expression gemeinsamer Proteine besteht eine weitere Übereinstimmung zwischen CNT und CD im Vorhandensein von Schaltzellen, die im CNT 20-30% und im CD 35-45% der Epithelzellen ausmachen. Die Schaltzellen haben essentiellen Anteil an der renalen Regulation des Säure-Base-Haushaltes, während sie für die Reabsorption von Na^+ keine direkte Rolle spielen [Überblick in Tisher et al. 1996]. In Übereinstimmung damit wurde in dieser Arbeit immunhistochemisch gezeigt, daß Schaltzellen im Gegensatz zu den sie umgebenden Zellen rENaC nicht exprimierten. Außerdem exprimierten sie im CNT auch NaCa nicht. Schaltzellen waren gleichzeitig früh im unreifen CNT und in weiten Teilen des CD zu identifizieren, was mit den Ergebnissen von Kim et al. übereinstimmt, die die Genese von Schaltzellen in CNT und CD ausführlich untersucht haben [Kim et al. 1994 und 1996]. Danach entstehen Schaltzellen sehr früh während der Reifung aus undifferenzierten Tubuluszellen und vermehren sich später mitotisch. Das Vorkommen von Schaltzellen in CNT und CD wurde als Indiz für das Abstammen des CNT von der CD-Anlage gewertet [Kaissling et al. 1979]. Nach den Ergebnissen von Kim et al. gibt es aber keinen gemeinsamen Ausgangsfokus für die Schaltzelldifferenzierung in CNT und CD, stattdessen differenzieren sich die Schaltzellen unabhängig voneinander. Demnach könnte der CNT hinsichtlich der Schaltzellgenese ebenso gut Abkömmling des nephrogenen Blastems sein. Das Entstehen von Schaltzellen würde durch teilweise Übereinstimmung im zellulären Differenzierungsprogramm von Zellen der CD-Anlage und Zellen des nephrogenen Blastems zu erklären sein.

Neben der schon angesprochenen Ca^{++} -reabsorptiven Funktion des CNT ist dieser Tubulusabschnitt auch am mineralokortikoidabhängigen Transport von Na^+ beteiligt, was zunächst durch physiologische Studien [Madsen et al. 1986] und später durch den histochemischen Nachweis von rENaC in CNT-Zellen [Duc et al. 1994] belegt wurde. Da bei pathologischen Mineralokortikoidspiegeln Störungen der renalen Ca^{++} -Exkretion vorkommen, gibt es offensichtlich eine funktionelle Relation zwischen der renalen Ca^{++} -Reabsorption und der Wirkung von Mineralokortikoiden. So ist der Hypoaldosteronismus, wie er beim Morbus

Addison vorkommt, häufig von einer erhöhten renalen Ca^{++} -Reabsorption begleitet, während der Hyperaldosteronismus, wie er beim Morbus Conn vorkommt, mit erniedrigter Ca^{++} -Reabsorption bzw. erhöhter Ca^{++} -Exkretion einhergeht [Walser et al. 1963, Massry et al. 1967, Rossi et al. 1995]. Dieser Effekt kommt offenbar nicht durch den direkten Einfluß von Mineralokortikoiden auf die Ca^{++} -Reabsorption zustande [Massry et al. 1967], sondern durch einen indirekten Einfluß über die Na^+ -Reabsorption. Einem funktionellen Zellmodell zufolge gelangt Ca^{++} vom Tubuluslumen, wahrscheinlich über einen apikalen Kanal, in die Epithelzelle und wird basolateral über eine ATP-abhängige Pumpe oder über den sekundär aktiven Transport via NaCa in das peritubuläre Interstitium befördert [Bourdeau et al. 1991]. Ein verstärkter apikaler Na^+ -Einstrom, wie durch Mineralokortikoide bewirkt, führt zu einer Erhöhung des intrazellulären Na^+ -Gehaltes, und damit zur Abnahme des Na^+ -Konzentrationsgradienten. Da der Na^+ -Konzentrationsgradient aber die Antriebskraft für den basolateralen Transport von Ca^{++} durch den sekundär aktiven NaCa darstellt, wird der basolaterale Ca^{++} -Auswärtstransport durch einen Abfall dieses Gradienten gebremst. Im Extremfall könnte der Transport über NaCa sogar in seiner Richtung umgekehrt werden, so daß Ca^{++} von der Blutseite her in die Zelle gelangt, anstatt die Zelle auf diesem Weg zu verlassen [Bourdeau et al. 1991]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Expression von NaCa im reiferen Nephron tatsächlich über ihre ganze Ausdehnung in Koexpression mit rENaC stattfindet. Die Expression beider Proteine beginnt zusammen am Beginn des DCT2 und setzt sich entlang des gesamten CNT in Kolokalisation fort. Damit besteht also eine plausible histotopographische Grundlage für die Hypothese, daß der beschriebene Einfluß von Mineralokortikoiden auf den Ca^{++} -Haushalt durch rENaC vermittelt ist. Auch die Kolokalisation von NCC und NaCa im DCT2 könnte in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen. Denn analog zum rENaC-vermittelten Na^+ -Einstrom kann der Na^+ -Konzentrationsgradient natürlich auch durch den sekundär-aktiven Na^+ -Transport via NCC beeinflusst werden. Damit könnte eine mineralokortikoidstimulierte Aktivierung von NCC (s. 6.2) ebenfalls zu dem oben beschriebenen Mechanismus beitragen und zu erhöhter Ca^{++} -Exkretion führen.

5.4 Sammelrohr (CD)

Durch die subkapsuläre Induktion neuer Nephrone vergrößert sich die Niere während ihrer Ontogenese exzentrisch. Gleichzeitig verlängert sich das CD-System durch zentrifugales Auswachsen, neue Nephrongenerationen zu induzieren und zu drainieren [Osatanondh et al. 1966]. Daraus ergibt sich für den CD ein von subkapsulär nach medullär zunehmender Reifegradient. Während der jüngste Teil des CD, die subkapsuläre Ampulle, keines der untersuchten Proteine exprimiert, wies der ältere CD-Anteil während der ersten postnatalen Tage ein interessantes Expressionsmuster auf. So war rENaC schon am 1. Tag post partum im gesamten subampullären CD in hoher Konzentration nachweisbar, wohingegen 11HSD zunächst nur in den reiferen CD-Anteilen, medullär sowie innerkortikal, zu finden war. Diese Beobachtung ist von Bedeutung, weil die Expression von rENaC einerseits auf eine frühe Mineralokortikoidwirkung im äußeren CD hinweist, andererseits aber durch das Fehlen von 11HSD noch keine Steroidhormonselektivität des MR vorliegen kann. Daß der MR schon sehr früh im CNT und CD exprimiert wird, konnte an Kaninchen- [Farman 1992] und Mäusenieren (unveröffentlichte Ergebnisse von Prof. Dr. N. Farman) gezeigt werden. Bei der neonatalen Rattenniere wurde MR zwar nicht in situ lokalisiert, es wurde aber in homogenisiertem Nierengewebe ein hoher MR-Spiegel sowohl auf Protein- [Stephenson et al. 1984] als auch auf mRNA-Ebene gemessen [Kalinyak et al. 1992]. Da der protektive Effekt für den MR durch 11HSD im postnatalen äußeren CD offenbar noch nicht vorliegt, müßte auch Glukokortikoid an den MR binden können. Glukokortikoid müßte somit während der ersten extrauterinen Tage analog zu den physiologischen Mineralokortikoid-effekten als Na^+ -retinierendes Hormon wirken. Dieser Zustand, der im adulten Organismus dem Pathomechanismus des AME (s. 2.1) zu Grunde liegt, könnte sich positiv für das Neugeborene auswirken. Angesichts einer noch unreifen renalen Volumenregulation und einer postnatal verminderten tubulären Reabsorptionskapazität muß nämlich eine positive Volumen- und Na^+ -Balance aufrechterhalten werden. Eine positive Na^+ -Balance ist für die normale postnatale Entwicklung essentiell [Überblick in Aperia et al. 1992 und Nigam et al. 1996]. Postnataler Na^+ -Mangel führt zu Wachstumsverzögerung und zu Veränderungen im Stoffwechsel [Fine et al. 1987, Wassner 1989], während eine Na^+ -Substitutionstherapie bei Frühgeborenen zu signifikanter Wachstums- und Gewichtszunahme führen kann [Chance et al. 1977]. Ein Entwicklungsabschnitt, in dem der MR teilweise ohne Schutz durch 11HSD vorliegt, also zusätzlich zu zirkulierendem Mineralokortikoid auch Glukokortikoid bindet,

könnte unter diesem Aspekt von Vorteil sein. Der diskutierte Mechanismus könnte dem Neugeborenen helfen während der postnatalen Phase, in der es besonders anfällig ist für Volumen- und Elektrolytverlust, sein inneres Milieu aufrecht zu erhalten. Am 8. postnatalen Tag war 11HSD schließlich auch im äußeren CD zu finden, so daß davon ausgegangen werden kann, daß der MR zu diesem Zeitpunkt entlang des gesamten distalen Tubulus Mineralokortikoidselektivität aufwies. Dazu passen die Ergebnisse von Stephenson et al., die Rattenjunge im Alter von 7-9 Tagen mit Aldosteron- und Kortikosteroninjektionen behandelt haben. Insgesamt war die Ansprechbarkeit der neonatalen Niere auf Steroide gering. Trotzdem konnte gezeigt werden, daß die Applikation von Aldosteron zu einer Erniedrigung der Na^+ -Exkretion auf ein Drittel führte, während die exogene Zufuhr von Kortikosteron keine Veränderung in der Na^+ -Ausscheidung bewirkte [Stephenson et al 1984]. Zu dieser offensichtlichen Mineralokortikoidselektivität paßt das in der vorliegenden Arbeit demonstrierte Expressionsmuster von 11HSD in der 8 Tage alten Niere.

Die gewonnenen Befunde zur Expression von 11HSD sind darüberhinaus auch hinsichtlich einer potentiellen entwicklungsspezifischen Rolle des Enzyms interessant. Die Nephrogenese stellt ein exzellentes Beispiel für die Differenzierung pluripotenter Zellen in hochspezialisierte Epithelzellen dar. Bei diesem Vorgang spielen neben Wachstumsfaktoren, Protoonkogenen und extrazellulären Matrixproteinen, vor allem Hormone eine Rolle [Überblick in Kanwar et al. 1997]. Eine für das Wachstum entscheidende Hormonklasse stellen dabei die Glukokortikoide dar, die während der Entwicklung Einfluß auf das Wachstum und die Differenzierung vieler verschiedener Organsysteme nehmen [Henning 1981, Kloet et al. 1988]. Dabei ist es von großer Wichtigkeit, daß der zirkulierende Spiegel freien Glukokortikoids eine gewisse Grenze nicht überschreitet, da das Hormon sonst zu strukturellen und funktionellen Fehlentwicklungen führt [Meyer 1985, Munck et al. 1992]. Als entscheidender Faktor, um den Fetus vor einem erhöhten Glukokortikoidspiegel zu bewahren, wird die durch 11HSD katalysierte Dehydratation des Hormones diskutiert [Moisan et al. 1992]. Dabei ist von Bedeutung, daß das durch 11HSD katalysierte Glukokortikoidderivat nicht nur, wie unter 2.1 beschrieben, seine Bindungsfähigkeit für den MR einbüßt, sondern auch an den Glukokortikoidrezeptor selber nur noch sehr schwach binden kann [Fuller et al. 1990]. Da 11HSD während der Ontogenese in vielen Geweben exprimiert ist [Brown et al. 1996, Stewart et al. 1994], wurde deshalb spekuliert, daß 11HSD neben seiner bekannten Rolle als “Wächter” über den MR während der Entwicklung auch als

“Wächter” über den Glukokortikoidrezeptor fungieren könnte [Moisan et al.1992]. In der vorliegenden Arbeit wurde für die postnatale Niere allerdings gezeigt, daß die Verteilung von 11HSD schon früh sehr spezifisch ist, und der adulten Verteilung ähnelt. 11HSD wurde in distalen Tubulusepithelzellen, für die eine Mineralokortikoidabhängigkeit bekannt ist, exprimiert und nicht etwa in Zellen des PT, die den Glukokortikoidrezeptor exprimieren [Farman 1992]. Demnach scheint der Haupteffekt von 11HSD, zumindest in der postnatalen Rattenniere, auch schon während der Entwicklung die gezielte Vermittlung der MR-Spezifität zu sein und weniger ein zusätzlicher Schutz des Glukokortikoidrezeptors vor einem möglichen Überangebot an Glukokortikoiden.

Funktionell ist bekannt, daß die Na^+ -Reabsorption im CD der inneren Medulla sensitiv gegenüber Amilorid, abhängig von Mineralokortikoid und elektrogen ist [Husted et al. 1990, Diezi et al. 1973]. In Übereinstimmung damit wurde in Northern Blots mRNA für alle drei Untereinheiten von rENaC in der inneren Medulla nachgewiesen [Volk et al.1995]. Dennoch konnten Duc et al. in ihrer umfassenden Lokalisationsstudie für rENaC rENaC immunhistochemisch und via In situ Hybridisierung zwar im CD des Kortex und der äußeren Medulla nachweisen, jedoch nicht in der inneren Medulla. Als mögliche Gründe dafür haben sie über eine weitere noch unbekannte Spleißvariante von rENaC und über eine zu geringe Sensitivität ihres Detektionssystems spekuliert [Duc et al. 1994]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von rENaC, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene gezeigt. Dabei fiel am 1., 3. und 4. Tag post partum eine starke Expression des Proteins auf, die sich entlang des medullären CD-Anteils bis zur Papillenspitze erstreckte. Da die anatomische Unterteilung in innere und äußere Medulla anhand des Überganges vom ATL in den TAL definiert ist, ist die Frage ab welchem Zeitpunkt während der Ontogenese die Unterteilung in innere und äußere Medulla zulässig ist, schwierig zu beantworten. Kim et al. stellen zwar fest, daß in der Ratte ab dem 3. Tag post partum eine klare Unterteilung möglich ist [Kim et al. 1994], jedoch verändert sich die Ausdehnung des ATL, und damit der histotopographische Bezug zur Unterteilung in innere und äußere Medulla, noch bis zum 8. Tag post partum [Neiss 1982a]. Trotzdem kann hinsichtlich der nachgewiesenen Expression von rENaC im CD des innersten Bereiches der Medulla am 3. und 4. Tag post partum wohl davon gesprochen werden, daß rENaC in der inneren Medulla exprimiert war. Hinzu kommt, daß die Expression von rENaC in diesem Bereich am 8. Tag zwar etwas abgeschwächt aber immer noch deutlich vorhanden war. Während der frühen postnatalen Entwicklung läßt sich rENaC

demnach mit histochemischen Mitteln im inneren MCD nachweisen, was mit den oben angesprochenen physiologischen [Husted et al. 1990, Diezi et al. 1973] und molekularbiologischen [Volk et al. 1995] Befunden übereinstimmt. In der adulten inneren Medulla ist die Expressionsrate für rENaC im CD-Epithel dann offenbar so niedrig, daß die mRNA bzw. das Protein unter der histochemischen Nachweisgrenze liegen [Duc et al. 1994]. Möglicherweise liegt auch hier der physiologische Nutzen der zunächst hohen Expression in einer Kompensation für die noch unreife Reabsorptionsleistung proximaler Tubulusegmente. In der Abnahme der Transkriptionsrate am 8. Tag könnte sich die Tatsache widerspiegeln, daß die proximale Transportkapazität mit zunehmender Reife wächst, so daß die Expressionsrate von rENaC im innermedullären CD ohne das Risiko eines Elektrolytverlustes auf ein niedrigeres Niveau reguliert werden kann.

Die Hauptfunktion des renalen Tubulusepithels ist der Transport. Deshalb stellt das Auftreten von Transportproteinen im Tubulus einen entscheidenden Schritt zur funktionellen Reifung der Niere dar. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, geht dem Auftreten der tubulären Transporter die mikrostrukturelle Reifung des Nephrons bis zu einem gewissen Grad voraus. Die untersuchten Transportproteine traten erst zu einem Zeitpunkt auf, als sich die Tubulusepithelmorphologie schon grob differenziert hatte, während in den frühesten nephrogenen Stadien noch keine Expression feststellbar war. Trotzdem fanden auch nach der initialen Expression der Transporter noch weitgehende morphologische Wachstums- und Umbauvorgänge statt. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, daß der extra- und der intrazelluläre Na^+ -Gehalt bedeutenden Einfluß auf die Funktion und das Wachstum von Tubuluszellen haben. So wurde gezeigt, daß eine erhöhte Salzaufnahme im Anschluß an eine partielle Nephrektomie die kompensatorische Hyperplasie der Restnieren beschleunigt [Tingle et al. 1973]. Aus renalen Zellkulturen ist bekannt, daß eine Erhöhung der intrazellulären Na^+ -Konzentration zu erhöhter Proteinsynthese, Wachstum und Zellteilung führt [Toback 1980, Johnson et al. 1998]. Speziell für das distale Nephron wurde demonstriert, daß es auf eine erhöhte Na^+ -Reabsorption mit Zellhypertrophie und -hyperplasie reagiert [Stanton et al. 1989]. Demnach ist es denkbar, daß der Na^+ -Transport, der durch die untersuchten Proteine vermittelt wird, auch auf das Wachstum und die strukturelle Differenzierung in der fortgeschrittenen Nephrogenese Einfluß nimmt. Auf welche konkrete Weise Umbauvorgänge

und Zellteilung durch eine erhöhte Na^+ -Konzentration stimuliert werden, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Hinsichtlich proximaler Tubuluszellen wurde aber demonstriert, daß der extrazelluläre Na^+ -Spiegel einen direkten, positiven Einfluß auf das Tubuluswachstum ausübt, ohne daß dabei in der Niere ansonsten relevante Wachstumsfaktoren und Cytokine involviert wären [Johnson et al. 1998]. Es wäre interessant, den postnatalen Na^+ -Transport über die untersuchten Proteine selektiv zu blockieren, um im Anschluß daran etwaige Störungen in der zellmorphologischen Entwicklung oder funktionelle Verschiebungen der tubulären Segmentproportionen zu untersuchen. Ein solcher Versuchsansatz könnte interessante Rückschlüsse auf eine spezifische potentielle Funktion der renalen Na^+ -Transporter während der Ontogenese ermöglichen.

6 Zusammenfassung

Das distale Nephron und das Sammelrohrsystem spielen als Regelstrecke für die Reabsorption von glomerulär filtriertem Natrium eine herausragende Rolle in der Elektrolyt- und Volumenhomöostase des Säugerorganismus. In jüngerer Zeit ist es gelungen einige Proteine, die entscheidend in den tubulären Na^+ -Transport involviert sind, zu klonieren, zu charakterisieren und ihre tubuläre Expression zu lokalisieren. Dies hat dazu beigetragen, die funktionelle Segmentation des renalen Tubulus besser zu verstehen und den Pathomechanismus verschiedener klinischer Syndrome zu erklären. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression mehrerer dieser Na^+ -Transportproteine mittels hochauflösender In situ-Hybridisierung und Immunhistochemie in der sich entwickelnden Rattenniere untersucht. Parallel dazu wurde vergleichend die feinmorphologische Entwicklung des distalen Nephrons auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene analysiert, um Hinweise auf die Beziehung zwischen Funktion und Struktur während der Nephrogenese zu gewinnen. Bei den untersuchten Geweben handelte es sich um Nieren von Rattenjungen, die im Alter von 1, 3, 4 und 8 Tagen perfusionsfixiert wurden, so daß ein repräsentativer Querschnitt der verschiedenen Stadien der Nephrogenese (Stadien I-V, Definition nach Kazimierczak 1970) untersucht werden konnte.

Die initiale Expression des Bumetanid-sensitiven **Na^+ - K^+ - 2Cl^- -Kotransporters (NKCC2)** wurde in Zellen der Macula densa (MD)-Region in Nephronen des Stadiums III lokalisiert. Die Expression von NKCC2 war von einer vorgezogenen ultrastrukturellen Reife der MD-Zellen begleitet, was für eine frühe regulatorische Aufgabe der MD sprechen könnte. Später dehnte sich die NKCC2-Expression in den aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife aus, bis das Epithel der gesamten Henle'schen Schleife einschließlich ihrer Haarnadelbiegung NKCC2 exprimierte. Der dünne Teil der langen, aufsteigenden Henle'schen Schleifen ohne NKCC2-Expression differenzierte sich erst später während der endgültigen Ausreifung in Stadium V. Die Expression von NKCC2 endete konstant einige Zellen distal der MD. Die initiale Expression des **Na^+ -Phosphat Kotransporters Typ 2 (NaPi2)** war im proximalen Konvolut von Nephronen im fortgeschrittenen Stadium III zu beobachten. Bei vergleichender Untersuchung von NaPi2 und NKCC2 fiel auf, daß das Epithel des absteigenden Schenkels der Henle'schen Schleife noch lange Zeit nicht NaPi2 exprimierte, während die NKCC2-

Expression im aufsteigenden Schenkel schon sehr ausgedehnt war, was auf eine verzögerte Reifung des absteigenden Schenkels hinweist. Der **Thiazid-sensitive Na^+ - Cl^- -Kotransporter (NCC)** wurde zuerst im Epithel des distalen Anteils des distalen Konvoluts (DCT) von Nephronen im frühen Stadium IV exprimiert. Später dehnte sich die NCC-Expression bis zum Übergang in die Henle'sche Schleife nach proximal aus, wo eine vorübergehende Überschneidung mit der NKCC2-Expression im post-Macula Segment vorlag. Die Immunreaktivität für NCC ergab in allen Stadien einen gerichteten Einbau des Proteins in die luminalen Zellmembran. Der basolaterale **$\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austauscher (NaCa)** der im Rattenephron typischerweise im Verbindungsstück (CNT) exprimiert wird, war zuerst im CNT-Epithel von Nephronen im frühen Stadium IV nachzuweisen. In den distalen Anteil des CNT dehnte sich die Immunreaktivität für NaCa erst im Laufe der weiteren Entwicklung aus. Auch die endgültige proximale Ausdehnung von NaCa, welche die klare Unterteilung des DCT in einen proximalen Anteil, DCT1, der NCC alleine exprimiert, und einen distalen Anteil, DCT2, in dem NCC mit NaCa koexprimiert ist, ermöglicht, war erst im weit fortgeschrittenen Stadium IV abgeschlossen. Der **epitheliale Na^+ -Kanal der Ratte (rENaC)**, der einen elektrogenen Na^+ -Transport in Abhängigkeit von Mineralokortikoid vermittelt, setzt sich aus drei Untereinheiten zusammen. Diese wurden zuerst in CNT, die zu Nephronen in Stadium III gehörten, detektiert. Begleitet war die Expression von dem Auftreten des Enzyms **11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 2 (11HSD)**, welches den ansonsten unspezifischen Mineralokortikoidrezeptor spezifisch macht. Die Expression beider Proteine ging der von NaCa im distalen CNT voraus. In Stadium IV überlagerte sich die Expression für 11HSD und für rENaC entlang des distalen Tubulus über ein längeres Segment mit dem Signal für NCC. Später war der Startpunkt der rENaC-Expression in exakter Kolo-kalisation mit dem Expressionsbeginn für NaCa am Übergang vom DCT1 in den DCT2 nachzuweisen. Entlang des Sammelrohres (CD) wurde ein wechselndes Expressionsmuster für rENaC und 11HSD beobachtet. Während beide Proteine zunächst stark im medullären Anteil des CD exprimiert waren, war im äußeren kortikalen Anteil des CD rENaC vorerst ohne 11HSD exprimiert, was eine funktionelle Bedeutung im Sinne des Aufrechterhaltens einer positiven Na^+ -Bilanz haben könnte. Später ließ die Expression beider Proteine im medullären CD nach und 11HSD wurde auch im äußeren kortikalen CD exprimiert. Grundsätzlich war 11HSD in Epithelzellen exprimiert, für die eine Mineralokortikoidabhängigkeit bekannt ist, was darauf hinweist, daß die Rolle von 11HSD auch während der Entwicklung die Vermittlung der Spezifität des Mineralokortikoidrezeptors zu sein scheint.

Anhand der gewonnenen Ergebnisse ist es gelungen, ein detailliertes Expressionsmuster für die entscheidenden Na^+ -Transport-assoziierten Proteine des distalen Nephrons und des Sammelrohrsystems während der Ontogenese zu erarbeiten. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß die strukturelle Entwicklung des Nephrons der Expression dieser Proteine bis zu einem gewissen Grad vorausgeht. Alle untersuchten Proteine waren erst nach den Stadien des renalen Vesikels und S-förmigen Körperchens zu detektieren. Andererseits traten sie teilweise deutlich vor Beginn der glomerulären Filtration auf, also bevor ihre reabsorptive Fähigkeit im Hinblick auf die Harnbereitung notwendig wurde. Hieraus ergibt sich die Möglichkeit einer speziellen Funktion dieser Proteine während der Nephrondifferenzierung. Die histotopographische Darstellung der Befunde beschreibt die normale Entwicklung der Nephronreifung und bildet damit auch eine wichtige Grundlage für die Erforschung funktioneller und morphologischer Abweichungen in der renalen Differenzierung.

7 Literaturverzeichnis

- Alper, S.L., J. Nalate, S. Gluck, H.F. Lodisch, and D. Brown. 1989. Subtypes of intercalated cells in rat kidney collecting duct defined by antibodies against erythroid band 3 and renal vacuolar H⁺-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:5429-5433.
- Aperia, A., O. Broberger, P. K. Thodenius, and R. Zetterström. 1972. Renal response to an oral sodium load in newborn full-term infants. *Acta Paediatr. Scand.* 61:670-676.
- Aperia, A., and Herin, P. 1975. Development of glomerular perfusion rate and nephron filtration rate in rats 17-60 days old. *Am. J. Physiol.* 228:1319-1325.
- Aperia, A., and G. Elinder. 1981. Distal tubular sodium reabsorption in the developing rat kidney. *Am. J. Physiol.* 240:F478-F491.
- Aperia, A., and G. Celsi. 1992. Ontogenic Processes in Nephron Epithelia. In: *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. D.W. Seldin and G. Giebisch editors. Raven Press, Ltd., New York. 803-829.
- Armanini, D., I. Karbowiak, and J.W. Funder. 1983. Affinity of liquorice derivatives for mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *Clin. Endocrinol.* 19:609-612.
- Arriza, J., C. Weinberger, and G. Cerelli. 1987. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA; structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science*, 237:268-275.

- Bachmann, S., H. Velázquez, N. Obermüller, R.F. Reilly, D. Moser, and D.H. Ellison. 1995. Expression of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter by rabbit distal convoluted tubule cells. *J. Clin. Invest.* 96:2510-2514.
- Bachmann, S. 1997. Distribution of NOS in the kidney. In: nitric oxide in the kidney, physiology and pathophysiology. Goligorsky, M. Gross, S. S. Chapman and Hall ITP, New York. 37-157.
- Bachmann, S., and W. Kriz. 1998. Histology, Cytology and Ultrastructure of the rat kidney. In Urinary System T.C. Jones, G.C. Hard, and U. Mohr, editors. Springer, New York. 3-36.
- Bachmann, S. 1999. Cell localization and ontogeny of sodium transport pathways in the distal nephron: perspectives in function and failure. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 8:31-38
- Barajas, L., K. Powers, O. Carretero, A.G. Scicli, and T. Inagami. 1986. Immunocytochemical localization of renin and kallikrein in the rat renal cortex. *Kidney Int.* 29:961-970.
- Barajas, L., and E.C. Salido. 1994. Pathology of the juxtaglomerular apparatus. In Renal Pathology. With Clinical and Functional Correlations. C.C. Tisher, and B.M. Brenner, editors. J.B. Lippincott Company, Philadelphia. 948-978.
- Berliner, R.W. 1976. The concentrating mechanism in the renal medulla. *Kidney Int.* 9:214-222
- Borke, J.L., A. Caride, A.K. Verma, J.T. Penniston, R. Kumar. 1989. Plasma membrane calcium pump and 28-kDa calcium binding protein in cells of rat kidney distal tubules. *Am. J. Physiol.* 257:F842-F849.

- Bostanjoglo, M., W.B. Reeves, R.F. Reilly, H. Velázquez, N. Robertson, G. Litwack, P. Morsing, J. Dörup, S. Bachmann, and D.H. Ellison. 1998. 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase, Mineralocorticoid Receptor, and Thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter Expression by Distal Tubules. *J. Am. Soc. Nephrol* 9:1347-1358.
- Bourdeau, J.E., and K. Lau. 1991. Regulation of cytosolic free calcium concentration in the rabbit connecting tubule: a calcium-absorbing renal epithelium. *J. Lab. Clin. Med.* 119:650-662.
- Brunner, F.P., F.C. Rector, and D.W. Seldin. 1966. Mechanism of glomerulotubular balance: Regulation of proximal tubular reabsorption by tubular volume, as studied by stopped-flow microperfusion. *J.Clin.Invest.*45(4):603-11.
- Brown, D., and J.L. Stow. 1996. Protein trafficking and polarity in kidney epithelium; from cell biology to physiology. *Physiol.Rev* 76(1):245-97.
- Brown, R.W., R. Diaz, A.C. Robson, Y.V. Kotelevtsev, J.J. Mullins, M.H. Kaufman, and J.R. Seckl. 1996. The ontogeny of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and mineralocorticoid receptor gene expression reveal intricate control of glucocorticoid action in development. *Endocrinology* 137:794-797.
- Canessa, C.M., J.D. Horisberger, and B.C. Rossier. 1993. Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration. *Nature* 361:467-470.
- Canessa, C.M., L. Schild, G. Buell, B. Thorens, I. Gautschi, J.D. Horisberger, and B.C. Rossier. 1994. Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* 367:463-467.

- Chabardés, D., M.C. Imbert, A. Montégut, and F. Morel. 1975. PTH sensitive adenyl cyclase activity in different segments of the rabbit nephron. *Pflügers Arch.* 354:229-239.
- Chance, G.W., Radde, I.C., Willis, D.M., Park, E., and I. Ackermann. 1977. Postnatal growth of infants of < 1.3 kg birth weight: Effects of metabolic acidosis, of caloric intake, and of calcium, sodium and phosphatase supplementation. *J. Pediatr.* 91:787-793.
- Chang, S.S., S. Grunder, A. Hanukoglu, A. Rosler, P.M. Mathew, I. Hanukoglu, L. Schild, Y. Lu, R.A. Shimkets, and C. Nelson-Williams et al. 1996. Mutations in subunits of the epithelial sodium channel cause salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudohypoaldosteronism type 1. *Nature Genet.* 12:248-253.
- Custer, M., M. Lötscher, J. Biber, H. Murer, and B. Kaissling. 1994. Expression of Na-Pi cotransport in rat kidney: Colocalization by RT-PCR and immunohistochemistry. *Am. J. Physiol.* 266:F767-F774.
- Diezi, J., P. Michoud, J. Aceves, and G. Giebisch. 1973. Micropuncture study of electrolyte transport across papillary collecting duct of the rat. *Am. J. Physiol.* 224:623-634.
- Dörup, J., and A.B. Maunsbach. 1982. The ultrastructural development of distal nephron segments in the human fetal kidney. *Anat. Embryol.* 164:19-41.
- Duc, C., N. Farman, C. M. Canessa, J.-P. Bonvalet, and B. C. Rossier. 1994. Cell-specific expression of epithelial sodium channel α , β , and γ subunits in aldosterone-responsive epithelia from the rat: Localization by in situ hybridization and immunocytochemistry. *J. Cell Biol.* 127:1907-1921.

- Eklblom, P. 1989. Developmentally regulated conversion of mesenchyme to epithelium. *FASEB J.* 3: 2141-2150.
- Ellison, D.H. 1994. Diuretic drugs and the treatment of edema: From clinic to bench and back again. *Am. J. Kid. Dis.* 23:623-643.
- Farman, N. 1992. Steroid receptors: Distribution along the nephron. *Semin. Nephrology.* 12:12-17.
- Figueroa, C.D., C.B. Gonzalez, S. Grigoriev, S.A. Abd Alla, M. Haasema, K. Jarnagin, and W. Müller-Esterl. 1995. Probing for the bradykinin B2 receptor in rat kidney by anti-peptide and anti-ligand antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* 43:137-148.
- Fine, B.P., A. Ty, N. Lestrangle, and O.R. Levine. 1987. Sodium deprivation growth failure in the rat: alterations in tissue composition and fluid spaces. *J. Nutr.* 117:1623-1628.
- Fischer, E., J. Schnermann, J.P. Briggs, W. Kriz, P.M. Ronco, and S. Bachmann. 1995. Ontogeny of NO synthase and renin in juxtaglomerular apparatus of rat kidney. *Am. J. Physiol.* 268:F1146-F1176.
- Funder, J.W., P.T. Pearce, R. Smith, and A.L. Smith. 1988. Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science.* 242:583-585.
- Fuller P.J., and K. Verity. 1990. Colonic sodium-potassium adenosine triphosphate subunit gene expression: ontogeny and regulation by adrenocortical steroids. *Endocrinology.* 127:32-38.

- Gamba, G., Saltzberg, S.N., Lombardi, M., Miyanoshita, A., Lytton J., Hediger, M.A., Brenner, B.M., and S.C. Hebert. 1993. Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2749-2753.
- Gamba, G., Miyanoshita, A., Lombardi, M., Lytton, J., Lee, W.-S., Hediger, M.A., and S.C. Hebert. 1994. Molecular cloning, primary structure, and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J. Biol. Chem.* 269:17713-17722.
- Goldsmith, D.I., Drukker, A., Blaurock, M.D., Edelmann, C.M., and Spitzer, A. 1979. Hemodynamic and excretory response of the neonatal canine kidney to acute volume expansion. *Am. J. Physiol.* 237:F392-F379.
- Guyton, A.C. 1991. Blood pressure control-Special role of the kidneys and body fluid. *Science* 252: 1813-1816.
- Haas, M. The Na-K-Cl cotransporter. 1994. *Am. J. Physiol.* 267:C869-C885.
- Hansson, J.H., C. Nelson-Williams, H. Suzuki, L. Schild, R. Shimkets, Y. Lu, C. Canessa, T. Iwasaki, B. Rossier, and R. Lifton. 1995. Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel γ subunit: genetic heterogeneity for Liddle syndrome. *Nature Gen.* 11:76-82
- Henning, S.J. 1978. Plasma concentrations of total and free corticosterone during development in the rat. *Am. J. Physiol.* 235:E451-E456.

- Hierholzer, K., and M. Fromm. 1995. Funktionen der Nieren. In *Physiologie des Menschen*. Schmidt, R.F. and G.Thews, editors. Springer-Verlag, Heidelberg 737-777.
- Horster, M. 1978. Loop of Henle functional differentiation in vitro perfusion of the isolated thick ascending segment. *Pflügers Arch.* 378:15-24.
- Horster, M. 1982. Expression of ontogeny in individual nephron segments. *Kidney Int.* 22:550-559.
- Husted, R.F., J.R. Laplace, and J.B. Stokes. 1990. Enhancement of electrogenic Na⁺ transport across rat inner medullary collecting duct by glucocorticoid and by mineralcorticoid hormones. *J. Clin. Invest.* 86:498-506.
- Igarashi, P., G.B. Vanden-Heuvel, J.A. Payne, and B. Forbush III. 1995. Cloning, embryonic expression, and alternative splicing of a murine kidney-specific Na-K-Cl cotransporter. *Am. J. Physiol.* 269:F405-F418.
- Johnson, D.W., H.J. Saunders, P. Poronik, D.I. Cook, M.J. Field, and C.A. Pollock. 1998. Physiological changes in extracellular sodium directly control human proximal tubule growth and transport. *Pflügers Arch.* 435(2):211-8.
- Kaissling, B., and W. Kriz. 1979. Structural analysis of the rabbit kidney. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 56: 1-123.
- Kaissling, B., and J. Dörup. 1995. Functional anatomy of the kidney. In *Handbook of experimental pharmacology*, vol 117, Springer, Berlin Heidelberg, New York, pp1-66.

- Kalinyak, J.E., J.G. Bradshaw, and A.J. Perlman. 1992. The role of development and adrenal steroids in the regulation of the mineralocorticoid receptor messenger RNA. *Horm. metab. Res.* 24:106-109.
- Kazimierczak, J. 1970. Histochemical observations of the developing glomerulus and juxtaglomerular apparatus. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. A* 78:401-413.
- Kim, J., C.C. Tisher, and K. M. Madsen. 1994. Differentiation of intercalated cells in developing rat kidney: an immunohistochemical study. *Am. J. Physiol.* 266:F977-F990.
- Kim, J., J-H. Cha, C.C. Tisher, and K. M. Madsen. 1996. Role of apoptotic and nonapoptotic cell death in removal of intercalated cells from developing rat kidney. *Am. J. Physiol.* 270:F575-F592.
- Kim, G.H., S.Masilamini, R. Turner, C. Mitchell, J.B. Wade, and M.A. Knepper. 1998. Mineralocorticoid regulation of thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter expression in rat distal convoluted tubule. *J.Am.Soc.Nephrol.* 9:37A.
- Kleinman, L.I. 1975. Renal sodium reabsorption during saline loading and distal blockade in newborn dogs. *Am. J. Physiol.* 228:1403-1408.
- Kloet, E.R., P. Rosenfeld, J.A.M. van Eekelen, W. Sutanto, and S. Levine. 1988. Stress, glucocorticoids and development. *Prog. Brain Res.* 73:101-116.
- Krozowski, Z.S., and J.W. Funder. 1983. Renal mineralocorticoid receptors and hippocampal corticosterone-binding species have identical intrinsic steroid specificity. *Proc. Natl. Acad. Science. USA.* 80:6056-6060.

- Kyosseff, Z., P.D. Walker, and W.B. Reeves. 1996. Immunolocalization of NAD-dependent 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in human kidney and colon. *Kidney Int.* 49:271-281.
- Larsson, L. 1975. The ultrastructure of the developing proximal tubule in the rat kidney. *J. Ultrastruct. Res.* 51:119-139.
- Lapointe, J.-Y., P.D. Bell, and J. Cardinal. 1990. Direct evidence for apical Na⁺:2Cl:K⁺ cotransport in macula densa cells. *Am. J. Physiol.* 258:F1466-F1469.
- Lifton, R.P. 1996. Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science* 272:676-680.
- Loffing, J., M. Le Hir, and B. Kaissling. 1995. Modulation of salt transport rate affects DNA synthesis in vivo in rat renal tubules. *Kidney. Int.* 47:1615-1623.
- Loffing, J., D. Loffing-Cueni, I. Hegyi, M.R. Kaplan, S.C. Hebert, M. Le Hir, and B. Kaissling. 1996. Thiazide treatment of rats provokes apoptosis in distal tubule cells. *Kidney Int.* 50:1180-1190.
- Madsen, K.M., and C.C. Tisher. 1986. Structural-functional relationship along the distal nephron. *Am. J. Physiol.* 250:F1-F15.
- Madsen, K.M., J. Kim, and C.C. Tisher. 1992. Intracellular band 3 immunostaining in type A intercalated cells of rabbit kidney. *Am. J. Physiol.* 262:F1015-F1022.

- Magagnin, S., A. Werner, D. Markovich, V. Sorribas, G. Stange, J. Biber, and H. Murer. 1993. Expression cloning of human and rat renal cortex Na/Pi cotransport. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:5979-5983.
- Massry, S.G., J.W. Coburn, L.W. Chapman and C.R. Kleeman. 1967. The acute effect of adrenal steroids on the interrelationships between the renal excretion of sodium, calcium, and magnesium. *J Lab Clin Med* 70:563-570.
- Merlet-Benichou, C., and C. Rouffignac. 1977. Renal clearance studies in fetal and young guinea pigs: effects of salt loading. *Am. J. Physiol.* 232:F178-F185.
- Meyer, J.S. 1985. Biochemical effects of corticosteroid on neural tissues. *Physiol. Dev.* 65:946-1020.
- Minuth, W.W., P. Gross, P. Gilbert, and M. Kashigarian. 1987. Expression of the alpha-subunit of Na/K-ATPase in renal collecting duct epithelium during development. *Kidney Int.* 31: 1104-1112.
- Moisan, M-P., C.R.W. Edwards, and J.R. Seckl. 1992. Ontogeny of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase in Rat Brain and Kidney. *Endocrinol.* 130:400-404.
- Morel, F., and A. Doucet. 1981. Sites of hormone action in the mammalian nephron. *Am. J. Physiol.* 240:F159-F164.
- Morel, F., and A. Doucet. 1992. Functional segmentation of the nephron. In *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. D.W. Seldin and G. Giebisch. Raven Press, New York. 1049-1086.

- Munck, A., and A. Naray-Fejes-Toth. 1992. The ups and downs of glucocorticoid physiology: permissive and suppressive effects revisited. *Mol. Cell Endocrinol.* *90:C1-C4*.
- Nelson, W.J. 1992. Regulation of cell surface polarity from bacteria to mammals. *Science* *258: 948-955*.
- Neiss, W.F. 1982a. Histogenesis of the loop of Henle in the rat kidney. *Anat. Embryol.* *164:315-330*.
- Neiss, W.F. 1982b. Morphogenesis and histogenesis of the connecting tubule in the rat kidney. *Anat. Embryol.* *165:81-95*.
- Nigam, S.K., A. Aperia, and B.M. Brenner. 1996. Development and Maturation of the kidney. In Brenner and Rector's: The kidney. 5th edition. By B.M. Brenner. W.B. Saunders Comp. Philadelphia. 72-98.
- Obermüller, N., S. Kunchaparty, D.H. Ellison, and S. Bachmann. 1996. Expression of the Na-K-2Cl cotransporter by macula densa and thick ascending limb cells of rat and rabbit nephron. *J. Clin. Invest.* *98:635-640*.
- Obermüller, N., P. Bernstein, H. Velázquez, R. Reilly, D. Moser, D.H. Ellison, and S. Bachmann. 1995. Expression of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter in rat and human kidney. *Am. J. Physiol.* *269:F900-F910*.
- Osathanondh, V., and E.L. Potter. 1966. Development of human kidney as shown by microdissection. IV. Development of tubular portions of nephrons. *Arch. Pathol.* *82:391-402*.

- Plotkin, M.D., M.R. Kaplan, J.W. Verlander, W-S. Lee, D. Brown, E. Poch, S. R. Gullans, and S. Hebert. 1996. Localization of the thiazide sensitive Na-Cl cotransporter, rTSC1 in the rat kidney. *Kidney. Int.* 50:174-183.
- Poláček, E., J. Vocel, L. Neugebauerová, M. Sebková, and E. Véchetová. 1965. The osmotic concentrating ability in healthy infants and children. *Arch. Dis. Child.* 40:291-295.
- Rane, S., A. Aperia, P. Eneroth, and S. Lundin. 1985. Development of urinary concentrating capacity. *Pediatr. Res.* 19:472-475.
- Reilly, R.F., C.A. Shugrue, D. Lattanzi, and D. Biemesderfer. 1993. Immunolocalization of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ exchanger in rabbit kidney. *Am. J. Physiol.* 265:F327-F332.
- Rossi, E., F. Perazzoli , A. Negro , C. Sani, S. Davoli , C. Dotti, M.C.Casoli, and G. Regolisti. 1995. Acute effects of intravenous sodium chloride load on calcium metabolism and on parathyroid function in patients with primary aldosteronism compared with subjects with essential hypertension. *Am J Hypertens* 11:8-13, 24.
- Rossier, B.C., and L.G. Palmer. 1992. Mechanisms of aldosterone action on sodium and potassium transport. In *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. D.W. Seldin, and G. Giebisch, editors. Raven Press, New York. 1373-1409.
- Rossier, B.C., C.M. Canessa, L. Schild, and J-D. Horisberger. 1994. Epithelial sodium channels. *Curr. Opinion Nephrol. Hypert.* 3:487-496.
- Rossier, B.C. 1997. Cum grano salis: The epithelial sodium channel and the control of blood pressure. *J. Am. Soc. Nephrol* 8:980-992.

Schnermann, J. 1998. Juxtaglomerular cell complex in the regulation of renal salt excretion. *Am. J. Physiol.* 274:R263-R279.

Shimkets, R.A., D.G. Warnock, C.M. Bositis, C. Nelson-Williams, J.H. Hansson, M.Schambelan, J.R.J. Gill, S. Ulick, R.V. Milora, and J.W. Findling et al. 1994. Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the β subunit of the epithelial sodium channel. *Cell.* 79:407-414.

Simon, D.B., F.E. Karet, J.M. Hamdan, A. Di Pietro, S.A. Sanjad, and R.P. Lifton. 1996a. Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nature genetics* 13:183-188.

Simon, D.B., C. Nelson-Williams, M.J. Bia, D. Ellison, F.E. Karet, A.M. Molina, et al. 1996b. Gitelman's variants of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na Cl cotransporter. *Nature Gen.* 12:24-30.

Simon, D.B., and R.P. Lifton. 1998. Ion transporter mutations in Gitelman's and Bartter's syndromes. *Curr. Op. Nephrol. Hypert.* 7:43-47.

Stanton B., and B. Kaissling. 1989. Regulation of renal ion transport and cell growth by sodium. *Am. J. Physiol.* 257:F1-F10.

Stephenson, G., M. Hammet, G. Hadaway, and J.W. Funder. 1984. Ontogeny of renal mineralocorticoid receptors and urinary electrolyte responses in the rat. *Am. J. Physiol.* 247:F665-F671.

- Stewart, P.M., A.B. Murry, and J. Mason. 1994. Type 2 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase in human fetal tissues. *J. Clin. Endocrin. Metab.* 78:1529-1532.
- Taugner, R., R. Waldherr, H.W. Seyberth, E.G. Erdös, J. Menard, and D. Schneider. 1988. The juxtaglomerular apparatus in Bartter's syndrome and related tubulopathies. *Virchows Arch* 412:459-470.
- Tingle, L.E., and I.L. Cameron. 1973. Cell proliferation response in several tissues following combined unilateral nephrectomy and high salt diet in mice. *Tex. Rep. Biol. Med.* 31:537-549.
- Tisher, C.C., K.M. Madsen. 1996. Anatomy of the kidney. In: *The Kidney*. B.M. Brenner, editor. W.B. Saunders Company, Philadelphia. 3-71.
- Toback, F. G. Induction of growth in kidney epithelial cells in culture by Na. 1980. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:6654-6656.
- Ulick S., C.K. Chan, K.N. Rao, J. Edassery, and F. Mantero. 1989. A new form of the syndrome of the apparent mineralocorticoid excess. *J. Ster. Biochem.* 32:209-212.
- Velázquez, H., A. Bartiss, P.L. Bernstein, and D.H. Ellison. 1996. Adrenal steroids stimulate thiazide-sensitive NaCl transport by the rat renal distal tubule. *Am. J. Physiol.* 39:F211-F219.
- Volk, K.A., R.D. Sigmund, P.M. Snyder, F.J. McDonald, M.J. Welsh, and J.B. Stokes. 1995. rENaC is the predominant Na⁺ channel in the apical membrane of the rat renal inner medullary collecting duct. *J. Clin. Invest.* 96:2748-2757.

- Walker, B.R., and C.R.W. Edwards. 1991. 11β -Hydroxysteroid dehydrogenase and enzyme-mediated receptor protection: Life after liquorice? *Clin. Endocrinol.* 35:281-289.
- Walser, M., B.H.B. Robinson, and J.W. Duckett, Jr. 1963. The hypercalcemia of adrenal insufficiency. *J. Clin. Invest.* 42:456-465.
- Wassner, S.J. 1989. Altered growth and protein turnover in rats fed sodium-deficient diets. *Pediatr. Res.* 26:608-613.
- Wilson, P.D. 1997. Epithelial cell polarity and disease. *Am.J.Physiol.* 1997 Apr; 272(4 Pt 2): F434-42
- Wong, W., S.-A. Hulton, C.M. Taylor, F. Raafat, C.J. Lote, and G. Lindop. 1996. A case of neonatal Bartter's syndrome. *Ped. Nephrol.* 10:414-418.
- Zhang, M.-Z., J.-L. Wang, H.-F. Cheng, R. Harris, and J.A. McKanna. 1997. Cyclooxygenase-2 in rat nephron development. *Am. J. Physiol.* 273:F994-F1002.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Roland Schmitt, an Eides Statt, daß diese Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde, daß die Dissertation auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig an entsprechender Stelle in der Arbeit angegeben sind.

(Roland Schmitt)